

Akademie der Wissenschaften in Wien  
Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse

# Monatshefte für Chemie

und

verwandte Teile anderer Wissenschaften

Schriftleitung: Der Sekretär der mathematisch-naturwissenschaftlichen  
Klasse E. Schweidler unter Mitwirkung von E. Abel, J. M. Eder,  
F. Emich, R. Kremann, A. Skrabal, E. Späth und R. Wegscheider

61. Band, 1. Heft

(Mit 13 Textfiguren)

(Ausgegeben im September 1932)



Leipzig 1932

Akademische Verlagsgesellschaft m. b. H.

Kommissionsverleger der Akademie der Wissenschaften in Wien: Hölder-Pichler-Tempsky A. G.  
Wien und Leipzig

Monatsh. Chem.

# INHALT

	Seite
Zinke A., Untersuchungen über Perylen und seine Derivate. (XXXVI. Mitteilung.) . . . . .	1
Brunner K. und Moser H., Über 5-Äthoxy-Indolinone . . . . .	15
Gorbach G. und Pick H., Die Ultraviolett-Inaktivierung von Saccharase in ihrer Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration und dem Ozon. (Mit 3 Textfiguren.) . . . . .	29
Gorbach G. und Kimovec D., Die Nachinaktivierung bestrahlter Saccharaselösungen und der Einfluß zugesetzten Tryptophans und Hefegummis. (Mit 3 Textfiguren.) . . . . .	39
Gorbach G. und Güntner H., Über Hefelipase. (Mit 5 Textfiguren.) . . . . .	47
Weiss R. und Knapp E., Über Triphenylmethane, deren Benzolkkerne miteinander verbunden sind. VII. Methylen-diphenylen-phenyl-methanketon . . . . .	61
Beutel E. und Kutzelnigg A., Zur Kenntnis der Fluoreszenz des Zinkoxydes. (Beiträge zur Lumineszenzanalyse. IV.) (Mit 2 Textfiguren.) . . . . .	69

## Folgende Abhandlungen sind eingelangt:

- Kailan A. und Raff R., Veresterungsgeschwindigkeiten von Alkoholen in Essigsäure.
- Machek G., Über die Einwirkung von Zyngas auf Phenole. I. Dizyan und die drei Dioxybenzole.
- Blau M. und Wambacher H., Über das Verhalten einer kornlosen Emulsion gegenüber  $\alpha$ -Partikeln. (Mit 2 Textfiguren.)
- Späth W., Versuche über den spektrographischen Nachweis kleinster Substanzmengen. (Mit 2 Textfiguren und 1 Tafel.)
- Musil A., Die Brönstedtsche kinetische Gleichung und die Debyesche Theorie. (Mit 3 Textfiguren.)
- Weiss R. und Beller A., Über die Kondensation des  $\alpha, \alpha'$ -Diphenyl- $\beta, \beta'$ -benzofurans mit ungesättigten Verbindungen. (I. Mitteilung.)
- Koller G., Über eine Synthese des Diazetyl-evernsäure-methylesters und des Tetraazetyl-gyrophorsäure-methylesters.
- Kremann R. und Baum R., Beiträge zur Kenntnis der galvanischen Spannungen und der Konstitution von Goldamalgamen. (Mit 4 Textfiguren.)
- Griengl F. und Baum R., Die galvanischen Spannungen der ternären Gold-, Zinn- und Quecksilberlegierungen. (Mit 10 Textfiguren.)
- Lämmermayr L. jun. und Kremann R., Über die Stellung des Goldes in der Spannungsreihe der Elektrolyse geschmolzener Metallegierungen. (Mit 1 Textfigur und 1 Tafel.)
- Kremann R., Pestemer M. und Bernstein P., Die Ultraviolettabsorption binärer Flüssigkeitsgemische. (I. Mitteilung.) Die U.V.-Absorption des binären Systems Azeton—Chloroform. (Mit 10 Textfiguren.)
- Dadien A., Pongratz A. und Kohlrusch K. W. F., Studien zum Ramaneffekt. XXIII. Das Raman-spektrum organischer Substanzen (Mehrfach substituierte Benzole II). (Mit 2 Textfiguren.)
- Lieb H. und Mladenović M., Weitere Untersuchungen über die  $\alpha$ -Elemol- und Elemonsäure. (V. Mitteilung.)
- Weiss R. und Abeles A., Über die Kondensation des  $\alpha, \alpha'$ -Diphenyl- $\beta, \beta'$ -benzofurans mit ungesättigten Verbindungen. (II. Mitteilung.) 1, 4-Diphenylnaphthalin und seine Derivate.
- Kailan A. und Ulleny P., Über Esterbildung in Glycerin und Äthylalkohol.
- Beutel E. und Kutzelnigg A., Über die Möglichkeit, die Rekristallisation des Silbers durch Anfärben mit Eisenchlorid zu verfolgen. (Mit 5 Textfiguren.)
- Beutel E. und Kutzelnigg A., Über einige Eigenschaften von Silberchloridschichten, die durch Einwirkung von Eisenchlorid auf Silberoberflächen gebildet wurden. (Mit 3 Textfiguren.)
- Müller A. und Krauß P., Synthese der  $\epsilon$ -Amino-*n*-heptylsäure.
- Müller A. und Krauß P., Über das 2-Methyl-hexamethylenimin.
- Müller A. und Krauß P., Über die Einwirkung von Alkali auf 6-Brom-*n*-hexylamin und 7-Brom-*n*-heptylamin.
- Koller G., Über die Ramalsäure.
- Brunner O., Hofer H. und Stein R., Zur Kenntnis der Amyrine II.
- Morsch K., Die Einwirkung von Ammoniak und Aminen auf die Ester ungesättigter Säuren. II. Die Einwirkung von Ammoniak, Methylamin und Diäthylamin auf Zimtsäure-äthylester.

Über die Aufnahme von Abhandlungen in die „Monatshefte für Chemie“ entscheidet die mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse der Akademie der Wissenschaften. Die Manuskripte, deren Vorlage gewünscht wird, können entweder an die Akademiekanzlei (Wien I. Universitätsplatz 2) oder an einen der auf der ersten Umschlagseite genannten Herren des Schriftleitungs-Ausschusses gesendet werden.



# Untersuchungen über Perylen und seine Derivate

(XXXVI. Mitteilung)

Von

ALOIS ZINKE

Aus dem Pharmazeutisch-chemischen Laboratorium der Universität in Graz

(Vorgelegt in der Sitzung am 6. Mai 1932)

## I. Über die Einwirkung von konz. Schwefelsäure auf Perylen.

Nach der Angabe von SCHOLL<sup>1</sup>, SEER und WEITZENBÖCK löst sich Perylen in konz. Schwefelsäure mit tief rotvioletter Farbe auf, beim Verdünnen der Lösung mit Wasser wird der Kohlenwasserstoff unverändert oder ausgeschieden.

Diese Angabe, die auch in die chemische Literatur aufgenommen wurde<sup>2</sup>, ist unseren Beobachtungen nach nicht ganz zutreffend.

Perylen löst sich in konz. Schwefelsäure zunächst mit satter, tiefgrüner Farbe, die aber schon nach wenigen Sekunden über Blaugrün, Blau (mit roter Fluoreszenz) in Rotviolett (in dünnen Schichten Violettrot) übergeht. Auch ist deutlich Geruch nach Schwefeldioxyd wahrzunehmen, ein Beweis, daß der Kohlenwasserstoff eine oxydative Veränderung durch die Schwefelsäure erleidet.

*Versuch a):* 0.1 g fein gepulvertes Perylen wurde mit 10 g konz. Schwefelsäure übergossen und durch Rühren bei Zimmertemperatur in Lösung gebracht. Während des Lösungsvorganges ließen sich die oben mitgeteilten Farbübergänge beobachten: Grün, Blaugrün, Blau (rote Fluoreszenz), schmutzig Blauviolett, Rotviolett. Schwefeldioxydentwicklung war deutlich wahrnehmbar. Nach einer Einwirkungsdauer von einer Minute wurde stark mit Wasser verdünnt. Man erhält eine grünlichbraungelbe, flockige Fällung, die sich beim Erwärmen zusammenballt und hiedurch leicht filtrierbar wird. Es wurde heiß filtriert und der Rückstand mit heißem Wasser gewaschen. Filtrat und Waschwasser sind bräunlichgelb gefärbt und fluoreszieren grün.

<sup>1</sup> Ber. D. ch. G. 43, 1910, S. 2205.

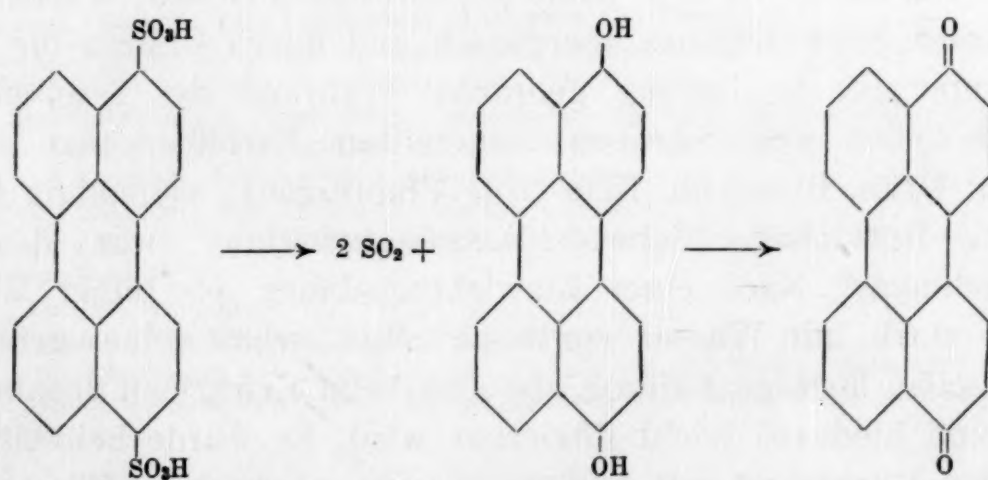
<sup>2</sup> P. PFEIFFER, Organische Molekülverbindungen, Stuttgart 1927, S. 205.

Diese Färbung ist wohl auf die Anwesenheit geringer Mengen Sulfonsäuren des Perylens zurückzuführen, die sich durch Kochsalz aussalzen lassen und wahrscheinlich identisch sind mit den Perylendisulfonsäuren Ch. MARSCHALKS<sup>3</sup>.

Auch der Filtrerrückstand enthält noch saure Produkte, denn beim Behandeln mit verdünnter heißer Natriumkarbonatlösung erhält man eine schwach gelb gefärbte, grün fluoreszierende Lösung. Der von den sauren Bestandteilen befreite Rückstand gibt, mit heißer, verdünnter Natronlauge und Natriumhydrosulfit erwärmt, die charakteristische kirschrote Küpe des Perylen-3,10-chinons. Der nicht verküpbare größere Teil ist unverändertes Perylen, er läßt sich am zweckmäßigsten durch Sublimation reinigen.

*Versuch b)* wurde in gleicher Weise ausgeführt wie *a)*, die Fällung mit Wasser aber erst nach 36stündigem Stehen bei Zimmertemperatur vorgenommen. Bei der Aufarbeitung wurden die Sulfonsäuren in etwas größerer Menge erhalten, die Ausbeute an Perylen-3,10-chinon ist aber nicht besser. Der Hauptteil besteht wiederum aus unverändertem Perylen.

Die beiden Versuche beweisen, daß Perylen gegen Schwefelsäure empfindlich ist, worauf schon Ch. MARSCHALK<sup>3</sup> aufmerksam machte. Perylen wird durch Schwefelsäure schon bei Zimmertemperatur zum Teil verändert, wobei sich geringe Mengen Sulfonsäuren und etwas Perylen-3,10-chinon bilden. Die Entstehung des letzteren erfolgt wahrscheinlich über die 3,10-Sulfonsäure nach dem Schema:



Durch Zusatz geringer Mengen Salpetersäure oder nitroser Gase zur Schwefelsäure kann man die Ausbeute an 3,10-Chinon

<sup>3</sup> Chem. Centr. 1927, S. 1833.



fast quantitativ gestalten und die Bildung der Sulfonsäuren unterbinden.

*Versuch c):* 0.4 g fein gepulvertes Perylen wurden in 40 g konz. Schwefelsäure bei Zimmertemperatur gelöst, zur Lösung 1 Tropfen konz. Salpetersäure ( $d = 1.4$ ) und ein Körnchen Ferrosulfat zugefügt und das ganze 48 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Der dann mit Wasser gefällte grünlich-gelbbraune Niederschlag wurde durch Absaugen von der Flüssigkeit getrennt und mit heißem Wasser gewaschen. Filtrat und Waschwasser sind farblos. Der Rückstand enthält keine sauren Bestandteile, er ist leicht und vollständig mit kirschroter Farbe verküpfbar. Rohausbeute 0.4 g. Die Reinigung kann durch Umkristallisieren aus siedendem Nitrobenzol vorgenommen werden. Man erhält das Perylen-3,10-chinon in etwas dunklen, braungelben Nadeln.

## II. Über Phenoxy-Verbindungen des Perylen-3,10-chinons.

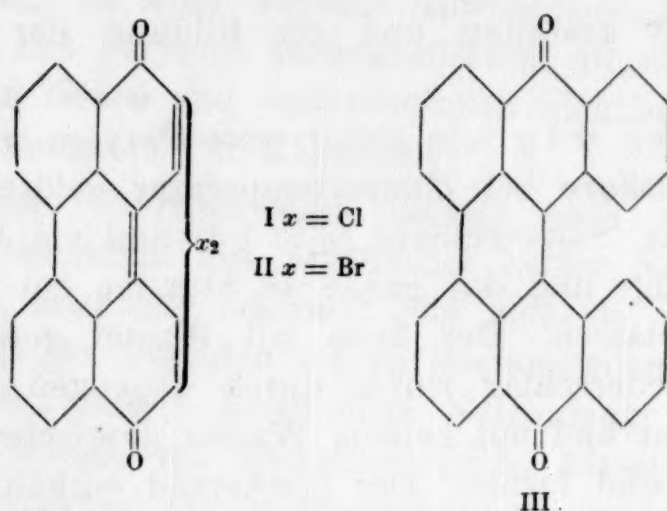
(Mit GOTTFRIED HAUSWIRTH.)

Dichlor- und Dibromperylene-3,10-chinon<sup>4</sup> (I) (II) sind Küpenfarbstoffe, die Baumwolle in lebhaften und schönen gelben Tönen färben. Die ausgezeichnete licht- und chlorechten Ausfärbungen weisen eine nur mittelmäßige Sodakochechtheit auf. Die geringe Beständigkeit der Färbungen gegen heiße Alkalien ist wohl auf die leichte Reduzierbarkeit der beiden Halogenchinone zurückzuführen. In der Kochprobe erfolgt teilweise Verküpfung durch die reduzierenden Eigenschaften der Baumwolle (Zellulose)<sup>5</sup>. Die leichte Reduzierbarkeit des Perylen-3,10-chinons und seiner Halogenabkömmlinge hängt mit dem ziemlich ausgeprägten chinoiden Charakter dieser Verbindungen zusammen, der wohl durch die freien Äthylenbindungen der chinoiden Kerne bedingt ist<sup>6</sup>. Mesobenzodianthron (Helianthron III), das auch als Abkömmling des Perylen-3,10-chinons aufgefaßt werden kann, gibt unseres Wissens kochechte Ausfärbungen. Im Helianthron ist der chinoide Charakter durch die angegliederten aromatischen Ringe herabgemindert, die Äthylenbindungen der chinoiden Kerne gehören auch den aufgefropften benzoiden Ringen an.

<sup>4</sup> ZINKE u. MITARBEITER, Monatsh. Chem. 40, 1919, S. 408; 44, 1923, S. 365, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 128, 1919, S. 408, 132, 1923, S. 365.

<sup>5</sup> R. SCHOLL, Ber. D. ch. G. 44, 1911, S. 1313.

<sup>6</sup> A. ZINKE u. A. PONGRATZ, Monatsh. Chem. 44, 1923, S. 379, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 132, 1923, S. 379.



ZINKE und KOLMAYER<sup>7</sup> versuchten durch Angliederung heterozyklischer Ringe an das Perylen-3, 10-chinon zu brauchbaren, dem Helianthron analog gebauten Produkten zu gelangen. Das von ihnen hergestellte Monoakridon der Perylen-3, 10-chinonreihe ist aber als Farbstoff unbrauchbar, da es keine wasserlösliche Küpe gibt.

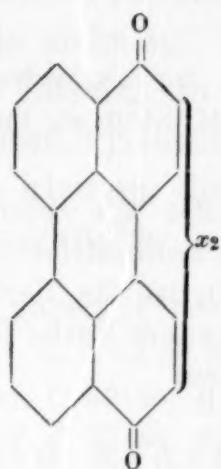
Die folgenden Versuche hatten den Zweck, zu prüfen, ob die leichte Reduzierbarkeit des Perylen-3, 10-chinons durch Einführung aromatischer Reste in die chinoiden Kerne vermindert werden kann. Dieser Gedanke ließ sich durch Austausch der Halogene in den Dihalogen-3, 10-chinonen gegen aromatische Reste verwirklichen. Am leichtesten gelingt der Austausch gegen Anilidoreste, er führt aber zu Produkten, die nur chlor- und kochunechte, blaustichige Ausfärbungen geben. Aussichtsreicher schien die Einführung von Phenoxygruppen, die auf die bekannte Weise leicht gelingt. Auch war zu erwarten, daß Phenoxygruppen keine wesentlichen Verschiebungen der Farbtöne verursachen werden.

Die Versuche wurden bisher mit folgenden Phenolen ausgeführt: Phenol, *p*-Chlorphenol, Thymol,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Naphthol. Kristallisierte Reaktionsprodukte konnten nur mit  $\beta$ -Chlorphenol und  $\beta$ -Naphthol erhalten werden, die Einwirkungsprodukte der übrigen genannten Phenole auf Dichlorperylen-3, 10-chinon waren amorph. Alle Reaktionsprodukte (ausgenommen der Chlorphenoxykörper) erwiesen sich als halogenfrei, ein Beweis, daß die Chloratome gegen entsprechende Phenoxygruppen ausgetauscht sind. Die mit Phenol (IV), Thymol (V) oder *p*-Chlorphenol (VI) erhaltenen Verbindungen sind leicht mit roter Farbe verküpfbar,

<sup>7</sup> Monatsh. Chem. 53 u. 54 (Wegscheider-Festschrift) 1929, S. 361, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 138, Suppl. 1929, S. 361.



die Ausfärbungen mit den beiden erstgenannten Verbindungen sind braun, das Di(*p*-chlorphenoxy-)perylene-3,10-chinon färbt Baumwolle aus roter Küpe ockergelb. Leider sind die Echtheitseigenschaften dieser Ausfärbungen nicht besser als jene mit den Halogen-3,10-chinonen erhaltenen. Die Struktur der Phenoxyverbindungen geht aus der Bildungsweise hervor, sie entspricht den Formeln IV—VI.



IV :  $x = \text{O} \cdot \text{C}_6\text{H}_5$

V :  $x = \text{O} \cdot \text{C}_6\text{H}_3 \cdot \text{CH}_3 \cdot \text{C}_6\text{H}_7$  (1, 3, 4)

VI :  $x = \text{O} \cdot \text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}$  (1, 4)

Die beiden Naphthoxyverbindungen sind nicht verküpfbar. Näher untersucht wurde nur das mit  $\beta$ -Naphthol erhaltene Produkt. Es ist halogenfrei, leicht kristallisierbar, seine Analysenwerte führen merkwürdigerweise zur Formel  $\text{C}_{40}\text{H}_{22}\text{O}_3$ . Vielleicht ist die Nichtverküpfbarkeit dieser Verbindung darauf zurückzuführen, daß auch ein Chinonsauerstoff in Reaktion getreten ist.

### Beschreibung der Versuche.

#### Di-phenoxy-perylene-3,10-chinon.

In eine Schmelze von 25 g Phenol wurden 5 g fein gepulvertes Dichlorperylene-3,10-chinon eingetragen, 4 g wasserfreies Kaliumkarbonat und eine kleine Menge Kupferpulver zugefügt und das Gemenge bei aufgesetztem Steigrohr drei Stunden zum Sieden erhitzt. Die Schmelze färbt sich violettstichig rotbraun. Man verdünnt mit Alkohol, gießt die Flüssigkeit in verdünnte Lauge, erhitzt zum Sieden, filtriert und wäscht das braune Reaktionsprodukt gründlich mit Wasser.

Die Substanz ist in Alkohol, Azeton und Eisessig auch in der Kochhitze fast unlöslich, ziemlich löslich in siedendem Xylol, leicht in heißem Nitrobenzol. Die Küpe ist weinrot, die Ausfärbung auf Baumwolle nach dem Verhängen braun. In konzentrierter Schwefel-

säure löst sich die Substanz schon in der Kälte mit tiefblauer Farbe auf.

Zur Analyse wurde die Verbindung durch Umlösen aus Xylol gereinigt. 4·065 mg Substanz gaben 12·370 mg CO<sub>2</sub> und 1·400 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>32</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>. Ber. C 82·38, H 3·90%.

Gef. C 82·99, H 3·85%.

#### Einwirkung von Thymol auf Dichlor-perylen-3,10-chinon.

20 g Thymol, 4 g Dichlorperylenchinon, 3 g wasserfreies Kaliumkarbonat und eine Spur Kupferpulver wurden 2½ Stunden im Ölbad auf 230 bis 240° erhitzt. Aufarbeitung wie früher.

Das dunkelbraune Reaktionsprodukt küpt mit roter Farbe, Baumwolle wird braun gefärbt. Die Lösungsfarbe in konzentrierter Schwefelsäure ist violettblau. In den tiefer siedenden Mitteln ist die Verbindung schwer löslich, in siedendem Nitrobenzol leicht mit brauner Farbe löslich. Kristallisiert konnte das Produkt nicht erhalten werden.

#### Di(*p*-chlorphenoxy)perylen-3,10-chinon.

In eine Schmelze von 20 g *p*-Chlorphenol und 4 g wasserfreiem Kaliumkarbonat wurden 4 g fein gepulvertes Dichlorperylen-3,10-chinon eingetragen, eine Spur Naturkupfer C zugefügt und das Gemenge im Ölbad drei Stunden auf 200—220° erhitzt. Die dunkelbraune Schmelze wurde, wie oben beschrieben, aufgearbeitet.

Das Reaktionsprodukt, ein gelbbraunes Pulver, küpt leicht mit violettroter Farbe, Baumwolle wird ockergelb ausgefärbt. In Alkohol und in Azeton ist die Verbindung auch in der Kochhitze unlöslich, ziemlich löslich in siedendem Xylol oder Eisessig, leicht löslich in heißem Nitrobenzol. Zur Reinigung kristallisiert man aus siedendem Xylol oder aus der 20fachen Menge Nitrobenzol um. Ziegelrote Nadeln. Die reine Verbindung löst sich in kalter konzentrierter Schwefelsäure mit violettblauer Farbe. Durch kochende Salpetersäure (*d* = 1·4) wird das Di(*p*-chlorphenoxy)perylen-3,10-chinon zur Phenanthren-1,8,9,10-tetrakarbonsäure abgebaut<sup>8</sup>.

4·080 mg Substanz gaben 10·710 mg CO<sub>2</sub> und 1·150 mg H<sub>2</sub>O

7·075 mg „ „ 3·755 mg AgCl.

C<sub>32</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>. Ber. C 71·77, H 3·01, Cl 13·25%.

Gef. C 71·59, H 3·16, Cl 13·13%.

<sup>8</sup> A. ZINKE, Monatsh. Chem. 57, 1931, S. 405; bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 139, 1930, S. 1071.



## Einwirkung von $\beta$ -Naphthol auf Dichlorperylen-3,10-chinon.

3 g gepulvertes Dichlorchinon wurden mit 20 g  $\beta$ -Naphthol, 4 g wasserfreiem Kaliumkarbonat und einer Spur Kupferpulver dreieinhalb Stunden im Ölbad auf 200—220° erhitzt. Aufarbeitung wie früher.

Das erhaltene Produkt löst sich in konzentrierter Schwefelsäure in der Kälte nicht auf, beim Erwärmen geht es mit schmutzigrüner Farbe in Lösung. In siedendem Nitrobenzol ist es gut löslich, beim Erkalten kristallisiert die Verbindung aus der violett-roten Lösung in kleinen, dunkelbraunen Nadelchen aus. Die Substanz ist nicht verküppbar.

3.980 mg Substanz gaben 12.790 mg  $\text{CO}_2$  und 1.380 mg  $\text{H}_2\text{O}$

4.073 mg „ „ 13.07 mg  $\text{CO}_2$  und 1.48 mg  $\text{H}_2\text{O}$

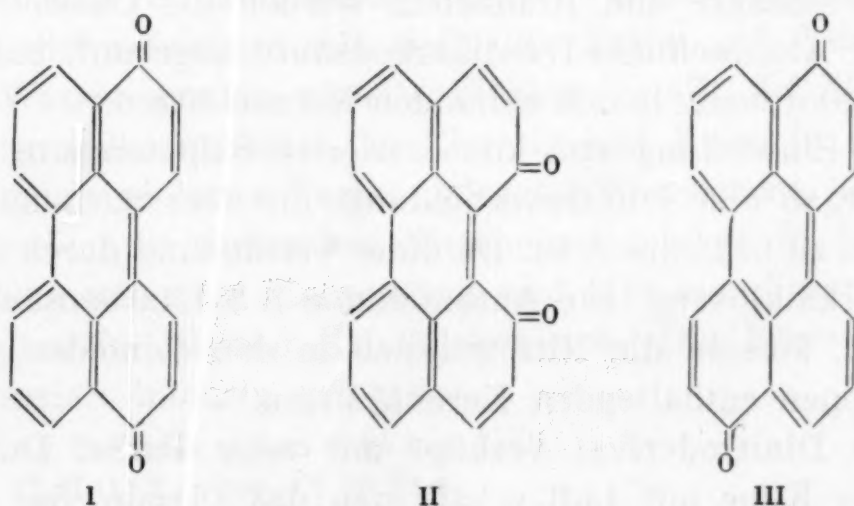
$\text{C}_{40}\text{H}_{20}\text{O}_3$ . Ber. C 87.56, H 3.68%.

Gef. C 87.64, 87.52, H 3.88, 4.07%.

### III. Über Derivate des Perylen-3,9-chinons.

(Mit GOTTFRIED HAUSWIRTH.)

Von den drei bekannten Chinonen des Perylens: 3,10-Chinon (I), 1,12-Chinon (II) und 3,9-Chinon (III), ist das letztgenannte noch am wenigsten untersucht. Um es besser zu charakterisieren,



haben wir sein Verhalten gegen Halogene und gegen Salpetersäure geprüft. Die Arbeiten werden durch den Umstand erschwert, daß das 3,9-Chinon nur schwer in größerer Menge frei von Perylen-3,4,9,10-dichinon zu erhalten ist<sup>9</sup>.

<sup>9</sup> A. ZINKE u. W. HIRSCH, Monatsh. Chem. 52, 1929, S. 181, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 138, 1929, S. 181.

Bei der Einwirkung von Chlor oder Brom auf Perylen-3, 10-chinon entstehen Tetrahalogenadditionsprodukte, die leicht 2 Mol. Halogenwasserstoff abspalten und in gut kristallisierende Dichalogensubstitutionsverbindungen übergehen<sup>10</sup>. Ähnlich verhält sich das 1, 12-Chinon, das von W. PENECKE<sup>11</sup> eingehender untersucht wurde. Auch dieses Chinon gibt zunächst Additionsprodukte, die leicht in einheitliche Substitutionsverbindungen überführbar sind.

Das 3, 9-Chinon nimmt ebenfalls leicht Brom und Chlor auf unter Bildung sehr schön kristallisierender Verbindungen. Diese sind aber den Analysenergebnissen nach nicht einheitlich. Chlor wird z. B. bei gewöhnlicher Temperatur in nitrobenzolischer Lösung rasch addiert, wobei zunächst ein in hellgelben, lanzettförmigen Nadeln kristallisierendes Additionsprodukt entsteht, das aber sehr zersetzlich ist. Schon bei schwachem Erwärmen spaltet es Chlorwasserstoff ab. Beim Umkristallisieren aus Nitrobenzol erhält man eine in dunklen Nadelchen ausfallende Substanz, die sich in konzentrierter Schwefelsäure mit blauer Farbe, in siedendem Nitrobenzol mit roter Farbe und starker roter Fluoreszenz löst. Den Analysenergebnissen nach ist sie aber nicht einheitlich, die Halogenwerte sind schwankend und liegen zwischen den Werten für ein Dichlor- und ein Trichlorperylen-3, 9-chinon. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Bromierung erzielt. Durch Einwirkung von Schwefelsäure und Braunstein werden die Chlorierungsprodukte zur Anthrachinon-1, 5-dikarbonsäure abgebaut, ein Beweis, daß die Chloratome in den chinoiden Kernen sitzen.

Die Einwirkung von konzentrierter Salpetersäure auf 3, 9-Chinon ergab eine Dinitroverbindung, die aber auch nur schwer einheitlich zu bekommen ist. Da diese Verbindung durch Schütteln mit Chlorkalklösung zur Anthrachinon-1, 5-dikarbonsäure abgebaut wird, müssen die Nitrogruppen in den chinoiden, die Carbonylgruppen enthaltenden Kernen sitzen.

Das Dinitroderivat verküpt mit roter Farbe. Durch Ausblasen der Küpe mit Luft erhält man das Diamin, das ebenfalls aus Nitrobenzol kristallisierbar ist.

Im Gegensatz zum 3, 10- und 1, 12-Chinon und ihren Derivaten zeigen das 3, 9-Chinon und seine Abkömmlinge in Lösung Fluoreszenzerscheinungen. Die Ursache liegt vielleicht im Bau

<sup>10</sup> A. ZINKE u. MITARBEITER, Monatsh. Chem. 44, 1923, S. 365, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 132, 1923, S. 305.

<sup>11</sup> Dissertation, Graz, Technische Hochschule 1929.



dieser Verbindungen. Das 3,10- und 1,12-Chinon sind Phenanthrenderivate (I und II), das 3,9-Chinon ist aber gemäß Formel III ein Abkömmling des Anthrazens. Den Zusammenhang mit Anthrazen zeigt auch der Abbau zur Anthrachinon-1,5-dikarbonsäure<sup>12</sup>. Aus Formel III geht auch hervor, daß die beiden chinoiden, die Carbonyle enthaltenden Kerne nicht gleichartig sind. Der eine Kern ist ortho-chinoid, der andere para-chinoid. Die Verschiedenheit der Kerne geht auch, wie später gezeigt werden soll, aus dem Verlauf der Hydrierung des 3,9-Chinons hervor.

### Beschreibung der Versuche.

#### Einwirkung von Chlor auf Perylen-3,9-chinon.

Von den vielen verschiedenen Versuchen, die wir ausführten, sei der folgende beschrieben:

In eine Suspension von 0.3 g 3,9-Chinon in 15 g Nitrobenzol, der eine Spur Jod und etwas Eisenfeile beigelegt waren, wurde bei Zimmertemperatur ein langsamer Chlorstrom eingeleitet. Das Chinon geht in Lösung, nach 1½ständigem Einleiten schieden sich hellgelbe, lanzettförmige Nadelchen ab. Zur Vervollständigung der Abscheidung wurde mit tiefsiedendem Petroläther verdünnt. Die hellgelben, sehr zersetzlichen Kristalle des Additionsproduktes geben beim Umkristallisieren aus siedendem Nitrobenzol dunkelviolette Nadeln. Diese lösen sich in kalter konz. Schwefelsäure mit tiefblauer Farbe auf, beim Verdünnen mit Wasser werden violette Flocken gefällt. In Alkohol ist das Chlorprodukt unlöslich, in Eisessig und Xylol in der Siedehitze wenig mit violetter Farbe und roter Fluoreszenz löslich, leichter löst es sich in kochendem Nitrobenzol (violett, in dünnen Schichten blau mit roter Fluoreszenz) und fällt aus dieser Lösung beim Erkalten in kleinen Kriställchen aus. Die Küpe ist rot und fluoresziert intensiv gelbgrün.

4.994 mg Substanz gaben 4.85 mg AgCl.

$C_{20}H_8O_2Cl_2$ . Ber. Cl 20.21%.

Gef. Cl 24.03%.

Bei der Bromierung des 3,9-Chinons in Nitrobenzol oder Benzol bei Wasserbadtemperatur erhält man ein aus Nitrobenzol in dunklen Nadelchen kristallisierendes Produkt, das in Schwefelsäure ebenfalls mit blauer Farbe löslich ist. Die Brombestimmung ergab schwankende Werte: 39.46 und 41.26% Br.

<sup>12</sup> A. ZINKE u. R. WENGER, Monatsh. Chem. 55, 1930, S. 55, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 138, 1929, S. 653.

### Abbau des Chlorproduktes zu Anthrachinon-1,5-dikarbonsäure.

In eine auf dem siedenden Wasserbade erwärmte Lösung von 0.1 g Chlor-3,9-chinon in 10 cm<sup>3</sup> konzentrierter Schwefelsäure wird unter Rühren in kleinen Anteilen 1 g Braunstein eingetragen. Die ursprünglich blaue Lösung wird über Rot fast farblos. Nach zweistündigem Erhitzen wird mit Wasser verdünnt und filtriert. Aus dem Filtrat fällt beim Stehen die Anthrachinon-1,5-dikarbonsäure in fast weißen Nadeln aus. Sie wurde durch Überführen in das Dilakton der Hydrochinonsäure charakterisiert.

### ?-Dinitro-perylen-3,9-chinon.

0.8 g 3,9-Chinon wurden mit einem Gemisch von 50 cm<sup>3</sup> konz. Salpetersäure und 50 cm<sup>3</sup> Eisessig zum Sieden erhitzt. Nach zweistündigem Kochen läßt man die braune Lösung erkalten, saugt den abgeschiedenen braunen Körper ab und wäscht gut mit Wasser aus. Rohausbeute 0.4—0.5 g. Zur Reinigung kristallisiert man mehrmals aus der hundertfachen Menge Nitrobenzol um. Kleine, braune Nadelchen, die sich in konz. Schwefelsäure mit violettroter, in siedendem Nitrobenzol mit roter Farbe lösen. In siedendem Xylol und in Eisessig ist die Nitroverbindung fast unlöslich, in siedendem Anilin mit braunroter Farbe löslich. Die Lösung in Anilin wird nach kurzem Kochen tief olivgrün (Anilidbildung).

3.99 mg Substanz gaben 9.32 mg CO<sub>2</sub> und 0.79 mg H<sub>2</sub>O

5.775 mg „ „ 0.346 cm<sup>3</sup> N,  $t = 24^\circ$ , 734 mm.

C<sub>20</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub>. Ber. C 64.51, H 2.16, N 7.53%.

Gef. C 63.70, H 2.22, N 7.19%.

### ?-Diamino-perylen-3,9-chinon.

0.35 g reines Dinitroperylen-3,9-chinon wurden, suspendiert in 135 cm<sup>3</sup> 1%iger Natronlauge, mit 1 g Natriumhydrosulfit auf dem siedenden Wasserbade verküpt. Nach beendeter Reduktion wurde die violette Küpe rasch filtriert und das Diamin durch Einblasen eines Luftstromes abgeschieden. Zur Reinigung wurde das mit Wasser und Alkohol gewaschene Rohprodukt aus siedendem Nitrobenzol mehrmals umkristallisiert. Lösungsfarbe in siedendem Nitrobenzol: Stahlblau; Abscheidung beim Erkalten: dunkle, fächerförmige Kristalle. In kalter konz. Schwefelsäure löst sich das Diamin mit roter Farbe, auf Zusatz von wenig Wasser wird die Lösung braun, viel Wasser scheidet das freie Amin in blaugrünen Flocken ab.

Mikro-Kjeldahl N-Bestimmung:

6.511 mg Substanz verbrauchten 4.387 cm<sup>3</sup> n/100 HCl.

C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>C<sub>2</sub>N<sub>2</sub>. Ber. N 8.98.

Gef. N 9.44%.



# Abbau des ?-Dinitroperylene-3,9-chinon zur Anthrachinon-1,5-dikarbonsäure.

1 g Dinitroverbindung wurde mit wenig Wasser fein verrieben, 200 cm<sup>3</sup> Chlorkalklösung<sup>13</sup> zugefügt und das Ganze 10 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt. Dann filtriert man, säuert das Filtrat mit verd. Salzsäure an, wobei die Anthrachinon-1,5-dikarbonsäure in weißen Nadeln ausfällt. Zur Reinigung fällt man mehrmals aus Ammoniak um.

4·580 mg Substanz gaben 10·87 mg CO<sub>2</sub> und 1·13 mg H<sub>2</sub>O.

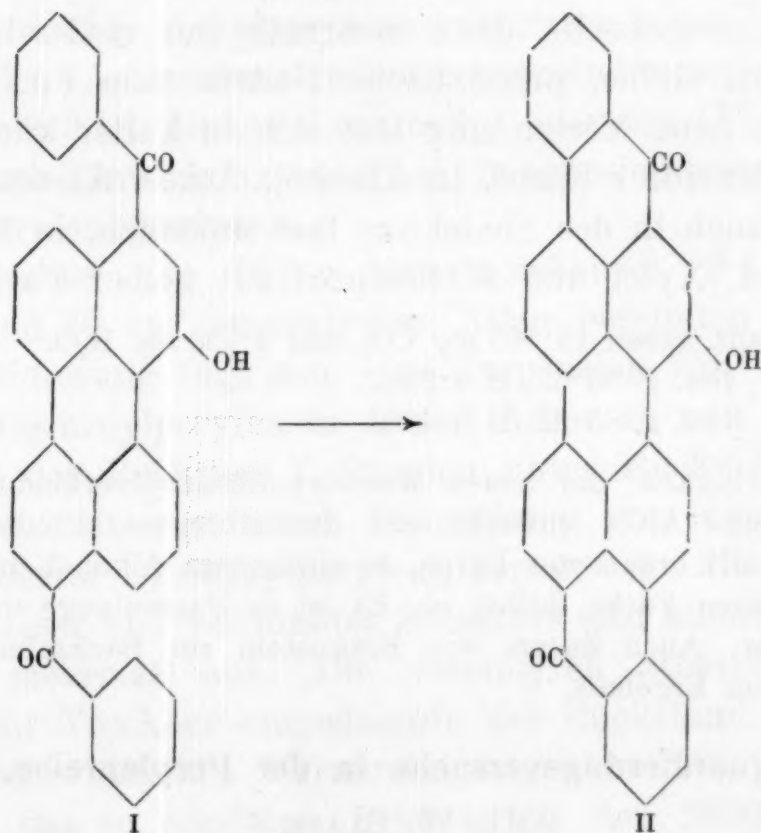
C<sub>16</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>. Ber. C 64·85, H 2·72%.

Gef. C 64·73, H 2·76%.

## IV. Verschiedene Versuche.

### 1-Monooxy-?-Dibenzoylperylene.

Die Versuche hatten zum Ziel über ein entsprechendes Monooxy-dibenzoylperylene (I) zum Oxyisoviolanthron (II) zu gelangen.



Durch Verbacken von 1,12-Dibenzoyldioxyperylene mit wasserfreiem Aluminiumchlorid und Braunstein<sup>14</sup> oder durch Verbacken von 1,12-Perylenchinon<sup>15</sup> mit Benzoylchlorid und Aluminiumchlorid bildet sich ein Farb-

<sup>13</sup> Die Chlorkalklösung wurde dargestellt nach der Vorschrift von Th. ZINKE, Ber. D. ch. G. 25, 1892, S. 405.

<sup>14</sup> A. ZINKE u. FR. HANSELMAYER, Noch nicht veröffentlichte Versuche.

<sup>15</sup> W. PENECKE, Diss. Graz.

stoff, der Baumwolle aus blauer Küpe in lebhaften grünen Tönen färbt. Dieser Farbstoff ist jedenfalls ein Dioxyisoviolanthron. Auf ähnliche Weise hofften wir, ausgehend vom Monooxyperylen, zu einem Monooxyisoviolanthron gelangen zu können.

Ein 1-Monooxy-dibenzoylperylene ließ sich aus 1-Oxyperylen durch die FRIEDEL-CRAFTSSCHE Reaktion leicht darstellen. Beim Verbacken mit wasserfreiem Aluminiumchlorid bildet sich aber auch bei Zusatz von Braunstein kein Farbstoff. Offenbar nehmen die Benzoylgruppen nicht die für einen Ringschluß zu Isoviolanthron nötigen Stellen ein.

0.3 g 1-Monooxyperylen (dargestellt nach WEITZENBÖCK und SEER<sup>16</sup> wurden mit 0.5 g  $\text{AlCl}_3$  und 0.3 g Benzoylchlorid in 8  $\text{cm}^3$  Schwefelkohlenstoff unter Feuchtigkeitsabschluß zunächst über Nacht im Eisschrank stehengelassen, dann unter Rückfluß zwei Stunden zum Sieden erhitzt. Durch Zersetzen der weinroten Reaktionsmasse mit Wasser und Abdestillieren des Schwefelkohlenstoffs erhält man einen braungelben Körper.

Das Produkt wurde zur Reinigung zunächst mit verdünnter Salzsäure ausgekocht, dann mehrmals aus siedendem Toluol umkristallisiert. Gelbe, prismatische Nadeln vom Fp. 227—228° (unkorr.). Die neue Verbindung löst sich in kalter konz. Schwefelsäure mit blutroter Farbe. In Alkohol, Äther, Azeton und Eisessig ist sie auch in der Siedehitze fast unlöslich, in kochendem Benzol, Toluol, Xylol und Nitrobenzol mit gelber Farbe löslich.

4.292 mg Substanz gaben 13.505 mg  $\text{CO}_2$  und 1.700 mg  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{34}\text{H}_{20}\text{O}_3$ . Ber. C 85.68, H 4.24%.

Gef. C 85.82, H 4.43%.

Beim Verbacken der neuen Monooxy-dibenzoylverbindung mit der vierfachen Menge  $\text{AlCl}_3$  entsteht ein dunkelbraunes Produkt, das in Schwefelsäure mit braunroter Farbe, in siedendem Alkohol und in Nitrobenzol mit brauner Farbe löslich ist. Es ist in Natronlauge unlöslich und nicht verküppbar. Auch Zusatz von Braunstein zur Backschmelze ändert nichts an diesem Ergebnis.

### Grignardierungsversuche in der Perylenreihe.

(Mit W. BLANK.)

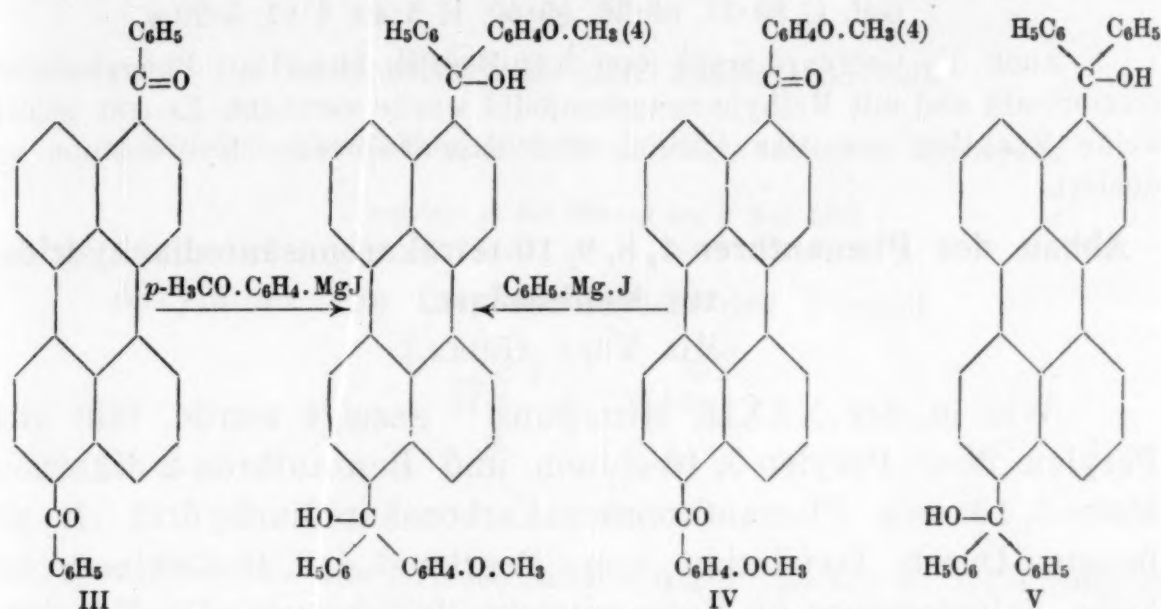
Gelegentlich der Darstellung des 3<sup>1</sup>, 9<sup>1</sup>-Diphenyl-3<sup>1</sup>, 9<sup>1</sup>-dioxy-3, 9-diäthylperylens<sup>17</sup> wurden auch einige andere Grignardierungsversuche in der Perylenreihe ausgeführt.

<sup>16</sup> Ber. D. ch. G. 46, 1913, S. 1994.

<sup>17</sup> A. ZINKE, O. BENNDORF u. W. BLANK, Monatsh. Chem. 56, 1930, S. 160, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 139, 1930, S. 430.



Versuche mit 3,9-Dibenzoylperylen (III) und ? 3,9-Dianisoylperylen (IV) hatten den Zweck, die Stellung der Aroylgruppen im Dianisoylperylen durch folgende Reaktionen zu erweisen:



Die beiden Aroylperylene reagierten aber mit den entsprechenden Arylmagnesiumhalogenverbindungen nicht.

Ein 3,9-Di-(diphenyl-oxymethyl-)perylen (V) ließ sich hingegen durch Einwirkung von Phenylmagnesiumbromid auf 3,9-Dibenzoylperylen gewinnen.

Zu einer aus 16.5 g Monobrombenzol, 2.4 g Magnesiumspänen und 50  $\text{cm}^3$  wasserfreiem Äther bereiteten Phenylmagnesiumbromidlösung fügt man eine Suspension von 1 g fein gepulvertem Dibenzoylperylen in 40  $\text{cm}^3$  Äther zu und kocht zur Beendigung der Reaktion 7 Stunden unter Rückfluß. Nach dem Absitzen trennt man durch Dekantieren vom ungelösten Anteil (unverändertes Dibenzoylperylen), zersetzt die ätherische Lösung mit Eiswasser und verdünnter Salzsäure und äthert die wässrige Schichte mehrmals aus. Die vereinigten ätherischen Auszüge werden zur Trockene eingedampft, der Rückstand durch Alkohol von leichter löslichen Verunreinigungen befreit. Zur Reinigung löst man das so erhaltene Produkt in der 2000fachen Menge Azeton, engt die filtrierte Lösung auf das halbe Volumen ein und versetzt bis zur Trübung mit heißem Wasser. Beim Erkalten scheidet sich die neue Verbindung in gelben, prismatischen Kristallen ab. Fp. nach mehrmaligem Umkristallisieren 327—328° (unkorr.). In kalter konz. Schwefelsäure löst sich die neue Verbindung mit grüner Farbe, in Alkohol, Eisessig, Benzol ist sie auch in der Siedehitze unlöslich, in siedendem Nitrobenzol gut löslich.

4·340 mg Substanz gaben 14·19 mg CO<sub>2</sub> und 2·13 mg H<sub>2</sub>O  
 4·120 mg „ „ 13·53 mg CO<sub>2</sub> und 1·94 mg H<sub>2</sub>O  
 3·829 mg „ „ 12·58 mg CO<sub>2</sub> und 1·95 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>46</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>. Ber. C 89·57, H 5·23%.

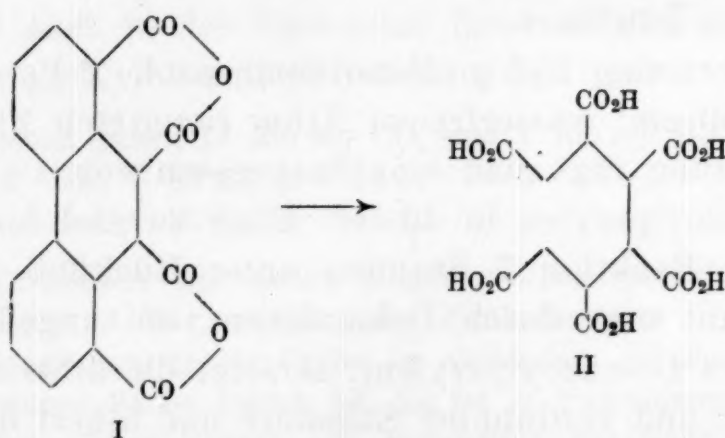
Gef. C 89·17, 89·56, 89·60, H 5·49, 5·27, 5·70%.

Auch die Grignardierung von 3,10-Perylenchinon mit Phenylmagnesiumbromid und mit Methylmagnesiumjodid wurde versucht. Es trat jedoch keine Reaktion ein, das Chinon wird zum Teil zum Hydrochinon reduziert.

### Abbau des Phenanthren-1, 8, 9, 10-tetrakarbonsäuredianhydrids zur Mellithsäure.

(Mit VERA GRIMM.)

Wie in der XXXII. Mitteilung<sup>18</sup> gezeigt wurde, läßt sich Perylen über Perylen-3, 10-chinon und Benzanthron-2-dikarbonsäure-5, 10 zum Phenanthrentetrakarbonsäuredianhydrid (I) abbauen. Durch Oxydation von Perylen-3, 4, 9, 10-dichinon mit konz. Salpetersäure im Rohr entsteht Mellithsäure (II). Um diese beiden Wege zu verknüpfen und zu erweisen, daß im Phenanthrentetrakarbonsäuredianhydrid ein hexasubstituiertes Benzolderivat vorliegt, haben wir auch das Dianhydrid zu Mellithsäure abgebaut.



0·5 g fein gepulvertes, reines Dianhydrid (I) wurden mit 6 cm<sup>3</sup> rauchender Salpetersäure im Rohr 8 Stunden auf 250° erhitzt. Das Oxydationsprodukt, farblose, glänzende, prismatische Kristalle, wurde unter Verwendung einer Glasfilternutsche abgesaugt, mit Salpetersäure gewaschen und bei 120° getrocknet. Es ist analysenreine Mellithsäure. Fp. im geschlossenen Röhrchen 290° (unkorr.).

3·876 mg Substanz gaben 5·99 mg CO<sub>2</sub> und 0·58 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>12</sub>H<sub>6</sub>O<sub>12</sub>. Ber. C 42·10, H 1·77%.

Gef. C 42·15, H 1·67%.

<sup>18</sup> Monatsh. Chem. 57, 1931, S. 405—420, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 139, 1930, S. 1071—1086.



## Über 5-Äthoxyindolinone

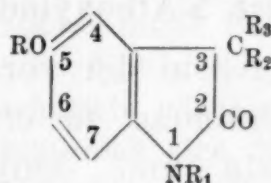
Von

KARL BRUNNER und HEIMO MOSER

Aus dem Chemischen Institut der Universität in Innsbruck

(Vorgelegt in der Sitzung am 6. Mai 1932)

Alkyläther von Oxyindolinonen der Formel



versprechen, für die Erforschung einiger Alkaloide willkommene Anhaltspunkte zu bieten. Sie sind beständiger und synthetisch leichter herzustellen als die entsprechenden freien Oxyindolinone. Geht man vom käuflichen *p*-Anisidin oder *p*-Phenetidin aus, führt diese Amine nach bekanntem Verfahren in die entsprechenden Phenylhydrazine über und stellt durch Erwärmen mit den erforderlichen Fettsäuren die Säurehydrazide her, so erhält man durch Erwärmen eines innigen Gemenges der Hydrazide mit gebranntem Kalk nach dem Verfahren von K. BRUNNER<sup>1</sup> mit hinreichender Ausbeute die gewünschten Methoxy- oder Äthoxyindolinone, deren Konstitution durch diese Synthese eindeutig gegeben ist.

Auf diese Weise wurde im hiesigen Institut aus *p*-Anisidin und Isobuttersäure mit einer Ausbeute von 30—33% des angewendeten Isobutyrylhydrazides 5-Methoxy-3,3-Dimethylindolinon hergestellt<sup>2</sup>.

Im Hinblick auf die letzten Resultate der Forschungen von EDGAR STEDMAN und GEORG BARGER über die Konstitution des Physostigmins<sup>3</sup> schien die Kenntnis von 5-Äthoxyindolinonen, die an der Stelle 3 neben Wasserstoff die normale oder *iso*-Propylgruppe oder neben einer Methyl- noch die Äthylgruppe enthalten, von Bedeutung.

<sup>1</sup> Monatsh. Chem. 18, 1897, S. 95, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 106, 1897, S. 104.

<sup>2</sup> G. WAHL, Monatsh. Chem. 38, 1917, S. 526, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 126, 1917, S. 393.

<sup>3</sup> Journ. Chem. Soc. London 127, 1925, S. 247 ff.

Wir suchten daher diese Indolinone aus Säurehydraziden, die mit *p*-Äthoxyphenylhydrazin und den entsprechenden Valeriansäuren hergestellt werden mußten, durch Erwärmen mit Kalk zu gewinnen. Außerdem beabsichtigten wir, mit Hilfe der gleichen Reaktion mit *p*-Äthoxymethylphenylhydrazin und den Valeriansäuren Indolinone herzustellen. Im ersten Falle mußten Indolinone, deren Stickstoffatom noch mit einem Atom Wasserstoff verbunden blieb, also sekundäre Indolinone, im zweiten Falle am Stickstoff methylierte, somit tertiäre Indolinone entstehen.

### I. Sekundäre 5-Äthoxyindolinone.

Um die an der Stelle 3 in der vorhin angedeuteten Weise substituierten 5-Äthoxyindolinone zu erhalten, mußten vorerst mit *p*-Äthoxyphenylhydrazin und denjenigen Valeriansäuren, die an der  $\alpha$ -Stelle nicht vollständig durch Alkyle besetzt sind, also mit *n*-Propylessigsäure, mit Isopropylessigsäure, ferner mit Methyläthyllessigsäure die *p*-Äthoxyphenylhydrazide hergestellt werden.

Zur Gewinnung des für alle drei Hydrazide erforderlichen *p*-Äthoxyphenylhydrazins befolgen wir das von J. ALTSCHUL<sup>4</sup> für die Herstellung dieser Verbindung ausgearbeitete E. FISCHERSCHE Verfahren, das über *p*-äthoxydiazobenzolsulfosaures, *p*-äthoxyphenylhydrazinsulfosaures Natrium zu *p*-Äthoxyphenylhydrazin führt.

Zur Darstellung der Valeriansäurehydrazide wurden je 24 g *p*-Äthoxyphenylhydrazin mit 18 g der einzelnen Valeriansäuren, d. i. ein Neuntel mehr als die berechnete äquimolekulare Menge, unter Berücksichtigung der von J. ALTSCHUL hervorgehobenen Zersetzung des *p*-Äthoxyphenylhydrazins beim Erwärmen mit Säuren auf Temperaturen über 100°, in Glaskölbchen unter Durchleiten von Wasserstoff im Ölbad auf 100 bis höchstens 110° fünf Stunden erwärmt und im Wasserstoffstrom erkalten gelassen.

Das Reaktionsgemisch wurde in Wasser, dem Ammonkarbonatlösung zur Bindung unveränderter Säure zugesetzt war, gegossen und mit wenig Äther zur besseren Verteilung der klebrigen Ausscheidung so lange geschüttelt, bis sich das Hydrazid fest abschied. Die Kristallmasse wurde auf einer Nutsche gesammelt, mit wenig Wasser gewaschen, scharf abgesaugt und endlich noch mit Äther gewaschen.

<sup>4</sup> Ber. D. ch. G. 25, 1892, S. 1843.



Von den erforderlichen Valeriansäuren wurde die normale und *iso*-Valeriansäure von Schering-Kahlbaum bezogen und vor der Verwendung destilliert, Methyläthyllessigsäure von uns nach dem durch K. v. AUWERS<sup>5</sup> verbesserten Verfahren von M. CONRAD und C. A. BISCHOFF<sup>6</sup> aus Malonsäureäthylester hergestellt.

Demgemäß stellten wir zunächst Äthylmalonsäureäthylester her, der für sich durch fraktionierte Destillation gereinigt wurde, dann führten wir diesen in Methyläthylmalonsäureester über, der bei der Destillation zwischen 207—210° übergang. Durch Verseifung und Kohlendioxydabspaltung der freien Säure erhielten wir endlich die Methyläthyllessigsäure. Um die beiden Prozesse in einer Operation zu bewirken, verfahren wir zuerst nach dem von E. PHILIPPI<sup>7</sup> angegebenen Verfahren und kochten den Ester mit 20%iger Salzsäure unter Rückflußkühlung, bis die öligen Tropfen verschwunden und die Kohlendioxydentwicklung beendet war. Die nach mehrmaligem Ausschütteln mit Äther gewonnene, mit Natriumsulfat getrocknete Lösung hinterließ eine Säure, die, fraktioniert destilliert, bei 173—175°, dem Kochpunkte der Methyläthyllessigsäure, übergang. Da aber die Verseifung und Kohlendioxydabspaltung sehr viel Zeit in Anspruch nahm, so bewirkten wir die Verseifung des Methyläthylmalonsäureesters nach den Angaben K. v. AUWERS'<sup>8</sup> mit alkoholischem Kali. Der nach Befolgung dieser Vorschrift erhaltene Trockenrückstand wurde zur Gewinnung der Säure mit Äther im Soxhletapparat extrahiert, die ätherische Lösung mit wasserfreiem Glaubersalz getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Äthers blieb zunächst die Säure noch flüssig, erstarrte aber allmählich. Zur Reinigung wurde der Rückstand auf der Nutsche abgesaugt, mit wenig Äther gewaschen und endlich im Vakuum über Schwefelsäure neben Paraffin vollständig vom Äther befreit. Wir erhielten so aus 228 g Methyläthylmalonsäureester 125 g freie Methyläthylmalonsäure, die bei 114° schmolz.

Die Kohlendioxydabspaltung wurde durch Erwärmen dieser Säure im Ölbad auf 160—170° bewirkt. Durch fraktionierte Destillation reinigten wir dann die Methyläthyllessigsäure, die bei 173—177° übergang und 80 g, d. s. 91.6% der Theorie, bezogen auf die verwendete Methyläthylmalonsäure, betrug.

#### a) 5 - Ä t h o x y - 3 - n - p r o p y l - 2 - i n d o l i n o n .

Das Ausgangsmaterial für dieses Indolinon war das auf eben angegebene Art aus 25 g Äthoxyphenylhydrazin und 18 g normaler Valeriansäure hergestellte Hydrazid, von dem aus obigen Mengen 12 g erhalten wurden.

<sup>5</sup> Liebigs Ann. 298, 1897, S. 166.

<sup>6</sup> Liebigs Ann. 204, 1880, S. 146.

<sup>7</sup> E. PHILIPPI und ALFRED UHL, Monatsh. Chem. 34, 1913, S. 728, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 122, 1913, S. 728.

<sup>8</sup> Liebigs Ann. 298, 1897, S. 167.

Nach dem Umkristallisieren aus Alkohol lag der Schmelzpunkt bei  $125.5^{\circ}$ .

3.930 mg Substanz gaben  $0.432 \text{ cm}^3$  Stickstoff bei 708 mm und  $19^{\circ}$ .

Ber. für  $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N}_2$ : N 11.87%.

Gef.: N 11.97%.

Zur Darstellung des Indolinons und der folgenden füllten wir ein inniges Gemenge von 6 g Hydrazid und 24 g vorher mit wenig Wasser gelöschttem und wieder frisch geglühtem Kalk in ein Säbelkölbchen so ein, daß das Gemenge, an die Hand geklopft, bis zum Kolbenhals reichte. Das Kölbchen war mit einem Zuleitungsrohr für getrockneten Wasserstoff und beim Ableitungsrohr mit einer Saugflasche verbunden, in der sich Lackmüslösung, die mit wenigen Tropfen Normalsäure gerötet war, befand. Außerdem führte durch den Kork der Saugflasche ein Tropftrichter, der Normalsäure enthielt. Der mit der Kalkmischung beschickte Säbelkolben tauchte bis zum Halse in ein Ölbad, das rasch auf ungefähr  $150^{\circ}$ , dann aber langsam erwärmt wurde, bis infolge der Ammonabspaltung die Blaufärbung der vorgelegten Lackmüslösung eintrat. Diese Temperatur suchten wir nur wenig zu überschreiten und erhitzten so lange, als noch Blaufärbung infolge der Ammonabgabe nach der Neutralisation mit Säure in weniger als fünf Minuten eintrat<sup>9</sup>.

Dann wurde die Vorlage beseitigt, die im säbelförmigen Ansatzrohr angesammelten öligen Zersetzungsprodukte entfernt und das noch am Rohr und Kolbenhals anhaftende ölige Zersetzungsprodukt mit Baumwolle und einigen Tropfen Äther fortgewischt. Nach dem Auflockern mit einem Draht ließ sich der Inhalt des Kolbens in einen geräumigen Kolben, in dem sich ungefähr  $50 \text{ cm}^3$  Wasser befanden, entleeren. Darin wurde das Reaktionsgemisch nach und nach mit  $150 \text{ cm}^3$  Salzsäure von 20% versetzt, der noch im Säbelkolben haftende Teil mit wenig Salzsäure nachgespült und endlich auf dem kochenden Wasserbade zur vollständigen Lösung des Kalkes etwa 30 Minuten erwärmt. Die so erhaltene saure, vom ungelösten Indolinon und klebrigen Zersetzungsprodukten trübe Flüssigkeit wurde bei den sekundären Indolinonen über Nacht erkalten gelassen und dann das Indolinon auf einer Nutsche gesammelt, bei den tertiären, später zu erwähnenden Indolinonen hingegen unmittelbar der Wasserdampfdestillation unterworfen, bei der die tertiären Indolinone mit geringen Mengen der verwendeten Valeriansäure in das Destillat gelangten.

Das auf diese Weise hergestellte 5-Äthoxy-3-n-propyl-2-indolinon, das, mit schmierigen Zersetzungsprodukten verunreinigt, auf der Nutsche blieb, hat als sekundäres Indolinon die Eigenschaft, mit 10—15%iger Kalilauge beim Erwärmen in Lösung zu gehen<sup>10</sup>. Wir brachten daher das nach kurzem Auswaschen auf der Nutsche gebliebene Indolinon mit wenig Wasser in einen

<sup>9</sup> In der Regel reichte einstündiges Erhitzen nach dem Auftreten von Ammoniak und eine Temperatursteigerung auf höchstens  $225^{\circ}$  hin.

<sup>10</sup> Beim Erkalten scheidet sich das Kaliumsalz, bei zu starker Verdünnung Indolinon ab.



Kochkolben, fügten zirka 15%ige Kalilauge hinzu und erwärmten auf dem kochenden Wasserbade und ließen auf dem Wasserbade stehen, wobei sich klebrige Massen auf dem Boden und der Wand ansetzten. Ohne zu filtrieren, konnten wir beim Abgießen der heißen Lösung in ein Becherglas die harzartigen Abscheidungen im Kolben größtenteils zurückhalten, die, neuerdings mit etwas Lauge erwärmt, noch geringe Mengen des Indolinons an diese abgaben. Die vereinigten alkalischen Lösungen wurden mit Salzsäure übersättigt. Nach mehrstündigem Stehen und vollständigem Erkalten sammelten wir das ausgeschiedene Indolinon auf einer Nutsche und bewirkten durch Lösung in salzsäurehaltigem Alkohol auf dem Wasserbad, Filtrieren und Erkaltenlassen die Abscheidung von kristallisiertem Indolinon, dessen Menge 1.2 g, d. i. 21.6% der theoretisch berechneten Menge, betrug. Durch Umkristallisieren aus Alkohol wurde das Indolinon gereinigt, es schmolz dann bei 119°.

4.888 mg Substanz gaben 12.734 mg Kohlendioxyd und 3.368 mg Wasser  
4.168 mg „ „ 0.248 cm<sup>3</sup> Stickstoff bei 706 mm und 17°.

Ber. für C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>N: C 71.18, H 7.82, N 6.39%.

Gef.: C 71.05, H 7.71, N 6.51%.

#### b) 5 - Ä t h o x y - 3 - i s o - p r o p y l - 2 - i n d o l i n o n .

Das aus Isovaleriansäure und *p*-Äthoxyphenylhydrazin in der für diese Hydrazide vorausgehend angegebenen Weise gewonnene Isovaleryl-*p*-äthoxyphenylhydrazid konnte trotz mehrmaligem Umkristallisieren aus Alkohol, Petroläther nicht analysenrein hergestellt werden. Es schmolz bei zirka 120°.

Das damit durch Erwärmen mit Kalk in der für die Darstellung des Indolinons unter a) angegebenen Art gewonnene und noch durch Behandlung der alkoholischen Lösung mit Tierkohle gereinigte Indolinon schmolz bei 132°.

4.182 mg Indolinon gaben 0.253 cm<sup>3</sup> Stickstoff bei 707 mm und 18°.

Ber. für C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>N: N 6.39%.

Gef.: N 6.60%.

#### c) 5 - Ä t h o x y - 3 - m e t h y l - 3 - ä t h y l - 2 - i n d o l i n o n .

Unter Befolgung der früher für die Darstellung der Valeriansäurehydrazide angegebenen Art wurde von uns aus 19 g der Methyläthyllessigsäure und 25 g *p*-Äthoxyphenylhydrazin nur 8 g dieses Hydrazids erhalten. Es schmolz nach dem Umkristallisieren aus Alkohol bei 146°.

3·932 mg Substanz gaben 0·436 cm<sup>3</sup> Stickstoff bei 706 mm und 20°.

Ber. für C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>: N 11·86%.

Gef.: N 12·00%.

Ausgehend von 5 g *p*-Äthoxyphenylhydrazid der Methyläthylelessigsäure wurde beim Erwärmen mit Kalk, wobei die Temperatur zur Abspaltung von Ammoniak auf 240° gesteigert werden mußte, nach der wie vorhin angegebenen Aufarbeitung nur 1 g, d. i. 21·6% der theoretisch berechneten Ausbeute, an Indolinon gewonnen. Es wurde nach dem Kristallisieren aus Alkohol in gut ausgebildeten, farblosen Nadeln erhalten. Schmelzpunkt 158°.

4·300 mg Substanz gaben 11·227 mg Kohlendioxyd und 2·951 mg Wasser

3·500 mg „ „ 0·211 cm<sup>3</sup> Stickstoff bei 705 mm und 18°.

Ber. für C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>N: C 71·18, H 7·82, N 6·39%.

Gef.: C 71·21, H 7·68, N 6·56%.

## II. Tertiäre 5-Äthoxyindolinone.

Mehr Beachtung als die sekundären 5-Äthoxyindolinone verdienen in bezug auf die Resultate der Konstitutionserforschung des Physostigmins die am Stickstoff methylierten, also die tertiären 5-Äthoxyindolinone, die aus den drei in Betracht kommenden Valeriansäuren entstehen konnten.

Es läge nahe, sie aus den einzelnen, vorher besprochenen drei sekundären Indolinonen mit methylalkoholischem Natrium und Jodmethyl durch mehrstündiges Erhitzen im Rohr<sup>11</sup> herzustellen. Versuche aber befriedigten nicht, da die Trennung mit Hilfe der Wasserdampfdestillation keine reinen Produkte lieferte. Möglicherweise waren bei der Einwirkung von Jodmethyl nicht bloß die Wasserstoffatome am Stickstoff, sondern auch an der Stelle 3 durch Methyl ersetzt oder gar die an dieser Stelle ursprünglich vorhandenen Radikale teilweise verdrängt worden.

Wir gingen daher zur Darstellung der am Stickstoff methylierten Indolinone vom *as*-Äthoxyphenylmethylhydrazin aus, das wir der Reihe nach mit normaler, mit *iso*-Valeriansäure und mit Methyläthylelessigsäure in die entsprechenden Hydrazide überführten, mit denen wir dann durch Erwärmen mit Kalk die einzelnen Indolinone herzustellen versuchten.

Das für alle drei Versuche erforderliche *as-p*-Äthoxyphenylmethylhydrazin stellten wir aus *p*-Phenetidin, ähnlich wie ERNST

<sup>11</sup> Monatsh. Chem. 18, 1897, S. 118, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II) 66, 1897, S. 118.



SPÄTH und OTTO BRUNNER<sup>12</sup> das *as-p*-Methoxyphenylmethylhydrazin aus *p*-Anisidin zu ihrer Synthese des Physostigmol-methyläthers gewonnen haben, durch Methylierung mit Dimethylsulfat, Nitrosierung und darauffolgende Reduktion mit Zinkstaub und Eisessig her. Um eine sichere Grundlage für die Synthese der erwünschten Indolinone zu haben, hat Herr MOSER die erforderlichen Zwischenprodukte möglichst rein hergestellt, analytisch geprüft und mit Derivaten identifiziert. 210 g *p*-Phenetidin gaben nach der Methylierung mit frisch destilliertem Dimethylsulfat nach der genau eingehaltenen Arbeitsweise von E. SPÄTH und O. BRUNNER 195 g *p*-Methylaminophenol-äthyläther als farbloses Öl, das bei 10 mm zwischen 119—121° überging.

Zur besseren Charakterisierung und zur Prüfung auf die Reinheit wurden die folgenden, in BEILSTEIN'S Handbuch, 4. Aufl., Berlin 1930, Bd. XIII, Syst. Nr. 1846, S. 442, nicht erwähnten Salze hergestellt und analysiert.

$C_9H_{13}ON \cdot HCl$ . Durch Einleiten von Chlorwasserstoff in eine Lösung der Base in trockenem Äther scheidet sich eine weiße Kristallmasse ab, die aus farblosen Blättchen besteht. Nach dem Absaugen, Waschen mit Äther und Trocknen im Vakuum gab das Salz bei der Analyse:

0.2381 g Substanz gaben 0.1842 g Chlorsilber.

Ber. für  $C_9H_{13}ON \cdot HCl$ : Cl 18.9%.

Gef.: Cl 19.15%.

*Pikrat*. Wird die Lösung der Base in trockenem Äther mit einer ätherischen Lösung der äquimolekularen Menge Pikrinsäure versetzt, so scheiden sich nach kurzem Stehen gelbe Kristallnadeln ab, die mit Äther gewaschen, im Vakuum getrocknet einen Schmelzpunkt von 168° zeigten.

3.361 mg Pikrat gaben 0.476 cm<sup>3</sup> Stickstoff bei 698 mm und 23°.

Ber. für  $C_{15}H_{16}O_8N_4$ : N 14.74%.

Gef.: N 15.00%.

Zur Darstellung des Nitrosokörpers des *p*-Methylaminophenol-äthyläthers wurden davon 50 g in Salzsäure (sp. G. 1.19) und 167 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und unter Eiskühlung mit einer Lösung von 28 g Natriumnitrit in 110 cm<sup>3</sup> Wasser tropfenweise versetzt. Die schließlich mit Äther aufgenommene Nitrosoverbindung blieb nach dem Abdestillieren als dunkel gefärbtes Öl zurück, das nach kurzem Stehen im Vakuum erstarrte. Nach dem Abpressen der Kristallmasse auf einem Tonteller blieben 23 g Nitrosoprodukt zurück. Für die Analyse wurde ein Teil aus warmem Petroläther umkristallisiert. Es erschienen beim Erkalten gelbe Blättchen, die bei 49° schmolzen.

3.913 g Substanz gaben 0.547 cm<sup>3</sup> Stickstoff bei 710 mm und 20°.

Ber. für  $C_9H_{12}O_2N_2$ : N 15.55%.

Gef.: N 15.21%.

<sup>12</sup> E. SPÄTH und O. BRUNNER, Ber. D. ch. G. 58, 1925, S. 522.

Zur Überführung des Nitrosokörpers in die *as*-Methylphenylhydrazinbase wurde die von E. FISCHER angegebene Verbesserung<sup>13</sup> seiner Darstellung von *as*-Methylphenylhydrazin befolgt.

Danach wurden 38 g des von Äther befreiten Nitrosokörpers in Eisessig (90 g) gelöst und die Lösung in kleinen Portionen unter fortwährendem Schütteln in eine Suspension von 160 g Zinkstaub mit 230 g Wasser eingetragen, wobei die Temperatur der in einem mit Kugelventil versehenen Kolben befindlichen Mischung zwischen 10° und 20° gehalten wurde. Nachdem das gesamte Nitrosoprodukt eingetragen war, blieb das Reaktionsgemisch noch unter öfterem Umschütteln bei Raumtemperatur vier Stunden und wurde schließlich zur Vollendung der Reaktion bis nahe zum Sieden erhitzt und heiß filtriert. Der zurückgebliebene Zinkstaub wurde noch mehrmals mit heißer verdünnter Salzsäure nachgewaschen. Aus den vereinigten Filtraten wurde die Base durch einen großen Überschuß von sehr konzentrierter Natronlauge abgeschieden und nach dem Erkalten mit Äther aufgenommen. Um die Hydrazinbase zu reinigen, wurde das nach dem Abdestillieren und vollständigem Vertreiben des Äthers zurückgebliebene Öl durch Zugabe der berechneten Menge verdünnter Schwefelsäure als Sulfat abgeschieden, auf der Nutsche abgesaugt und mit wenig Wasser gewaschen. Durch Zerlegung des in heißem Wasser gelösten Sulfates mit Natronlauge, Aufnahme der abgeschiedenen Base mit Äther, Trocknen der ätherischen Lösung mit geglühtem Kaliumkarbonat wurde dann die Base nach dem Abdestillieren des Äthers und durch Destillation des Rückstandes im Vakuum, wobei sie bei 10 mm Druck bei 137 bis 140° als farbloses Öl überging, rein erhalten. Von 38 g Nitrosoprodukt wurden 17 g, das sind 44% der berechneten Menge, an *as-p*-Äthoxyphenylmethylhydrazin erhalten.

Dieses Hydrazin wurde nun mit normaler Valeriansäure, mit Isovaleriansäure und mit Methyläthylelessigsäure erwärmt, um die für die Synthese der tertiären Indolinone von der empirischen Formel  $C_{14}H_{19}O_2N$  erforderlichen Hydrazide zu gewinnen.

In allen drei Fällen wurde in gleicher Weise verfahren.

In einem Kölbchen wurde das Gemisch von 17 g *as-p*-Äthoxyphenylmethylhydrazin und 12 g der entsprechenden Valeriansäure im Ölbad unter langsamem Durchleiten von getrocknetem Wasserstoff neun Stunden auf 100–120° erwärmt. Nach dem Erkalten im Wasserstoffstrome gossen wir das Gemisch in kaltes Wasser. Da das Produkt selbst nach mehrstündigem Stehen nicht fest wurde, nahmen wir es mit Äther auf, nachdem wir vor-

<sup>13</sup> Liebigs Ann. 236, 1886, S. 198.



her, um etwa freie Base zurückzuhalten, mit einigen Tropfen verdünnter Schwefelsäure versetzt hatten. Die ätherische Lösung, die noch ungebundene Valeriansäure enthielt, wurde durch Schütteln mit Ammonkarbonatlösung von dieser befreit und nach dem Abscheiden mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abdestillieren blieb das Hydrazid zunächst als gelbes Öl zurück, das aber nach längerem Verweilen im evakuierten, mit konzentrierter Schwefelsäure und Paraffin beschickten Exsikkator erstarrte. Die erhaltene Kristallmasse haben wir auf dem Tonteller abgepreßt und für die Herstellung der Indolinone ohne weiters verwendet.

a) Das mit *normaler Valeriansäure* gewonnene Valeryl-*p*-äthoxymethylphenylhydrazid wurde bei obigen Mengen mit einer Ausbeute von nur 9 g erhalten. Aus kochendem Petroläther umkristallisiert, schied es sich in farblosen Kristallen ab, deren Schmelzpunkt 63° war.

3.822 mg Hydrazid gaben 0.407 cm<sup>3</sup> Stickstoff bei 698 mm und 18°.

Ber. für C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>: N 11.20%.

Gef.: N 11.47%.

Beim Versuche, durch Erhitzen dieses Hydrazides mit Kalk das Indolinon zu gewinnen, mußte die Temperatur des Bades bis 250° gesteigert werden, um die Abspaltung von Ammoniak zu bewirken. Nach der Reaktion wurde das Produkt zur Lösung des Kalkes mit Salzsäure übersättigt und der Wasserdampfdestillation unterworfen. Mit den Wasserdämpfen ging etwas Valeriansäure und das zu erwartende Indolinon als Öl über. Da es auch nach mehrstündigem Stehen nicht erstarrte, so wurde das Destillat mit Äther geschüttelt, der das Indolinon und wenig Valeriansäure aufnahm, von der die ätherische Lösung durch Schütteln mit Sodalösung befreit wurde. Das nach dem Abdestillieren des Äthers der vorher mit geglühtem Kaliumkarbonat getrockneten Lösung als farbloses Öl zurückgebliebene Indolinon konnte weder durch längeres Stehen im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure noch durch starke Abkühlung zur Kristallisation gebracht werden. Weil auch eine fraktionierte Vakuumdestillation bei der vorliegenden geringen Menge keine hinreichende Reinigung versprach, wurde dieses Produkt, das wegen seiner Bildung und seiner Flüchtigkeit mit Wasserdampf als Indolinon bezeichnet werden darf, nicht analysiert.

b) Mit besserem Erfolg gelang die Darstellung des vom Isovaleryl-*p*-äthoxymethylphenylhydrazid herstellbaren Indolinons.

Das Hydrazid wurde auf gleiche Weise dargestellt und gereinigt wie das der normalen Valeriansäure. Die Ausbeute aus

gleichen Mengen der Komponenten betrug 6.7 g. Nach wiederholtem Umkristallisieren aus Petroläther lag der Schmelzpunkt des Isovaleryl-*p*-äthoxymethylphenylhydrazides bei 80.5°.

3.387 mg Substanz gaben 0.409 cm<sup>3</sup> Stickstoff bei 700 mm und 20°.

Ber. für C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>: N 11.20%.

Gef.: N 11.44%.

#### 5-Äthoxy-1-methyl-3-isopropyl-2-indolinon.

Das aus dem Isovaleryläthoxymethylphenylhydrazid auf die vorhin beschriebene Weise durch Erwärmen mit Kalk bereitete und nach dem Ansäuern mit Wasserdampf übergegangene Indolinon wurde in Äther aufgenommen, die ätherische Lösung mit Sodalösung durchgeschüttelt, mit geglühtem Kaliumkarbonat getrocknet und der Äther abdestilliert. Der zunächst ölige Rückstand kristallisierte nach kurzem Aufbewahren im Vakuumexsikkator. Nach dem Umkristallisieren aus kochendem Petroläther bildete das Indolinon farblose Kristalle, die bei 40° schmolzen.

4.986 mg Substanz gaben 13.221 mg Kohlendioxyd und 3.625 mg Wasser.

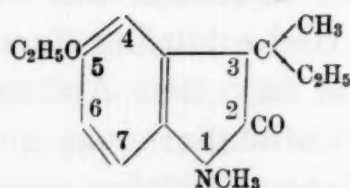
3.384 mg " " 0.194 cm<sup>3</sup> Stickstoff bei 712 mm und 18°.

Ber. für C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>O<sub>2</sub>N: C 72.06, H 8.21, N 6.01%.

Gef.: C 72.32, H 8.14, N 6.30%.

#### c) 5-Äthoxy-1-methyl-3-methyl-3-äthyl-2-indolinon.

Ein Indolinon dieser Bezeichnung, also von der Formel



soll, wie in der eingangs erwähnten Untersuchung von EDGAR STEDMAN und GEORG BARGER<sup>14</sup> erwähnt wurde, bei der katalytischen Hydrierung von 5-Äthoxy-1-methyl-3-methyl-3-vinyl-2-indolinon entstehen, das durch erschöpfende Methylierung aus Dehydroeseretholmethin von diesen Forschern erhalten wurde.

Zur Synthese dieses Indolinons stellten wir zunächst auf die vorhin angegebene Weise mit dem auf erwähntem Wege gewonnenen *as-p*-Äthoxyphenylmethylhydrazin und Methyläthyllessigsäure das Hydrazid her. Die Ausbeute an diesem Hydrazid war in der Regel gering, sie betrug nur 8—10% der berechneten Menge. Wiederholt aus Petroläther umkristallisiert, schmolz es bei 78°.

<sup>14</sup> Journ. Chem. Soc. London 127, 1925, S. 250, Formel X.



5.472 mg Substanz gaben 0.577 cm<sup>3</sup> Stickstoff bei 713 mm und 16°.

Ber. für C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>: N 11.20%.

Gef.: N 11.68%.

8 g dieses Hydrazides wurden wie in den voraus erwähnten Fällen mit der vierfachen Menge frisch geglühten Kalks in einer vorgewärmten Reibschale innig verrieben, hierauf in einem Säbelkolben unter Durchleiten von Wasserstoff in einem Legierungsbade erhitzt. Bei 210° begann die Ammonabspaltung und dauerte nach der Steigerung der Temperatur auf 225° ungefähr eine Stunde, wie in der eingangs beschriebenen Weise an der vorgelegten Lackmuslösung erkannt wurde. Nachdem eine geringe Menge von Destillationsprodukten aus der säbelförmigen Vorlage entfernt wurde und der Kolbenhals mit ätherfeuchter Baumwolle gereinigt war, wurde der Inhalt des Kolbens in Wasser geschüttet, mit Salzsäure übersättigt und der Wasserdampfdestillation unterworfen. Das Destillat schüttelten wir mit Äther aus, behandelten die abgetrennte ätherische Lösung zur Entfernung von Spuren der Methyläthyllessigsäure mit Sodalösung und trockneten sie nach der Abscheidung mit geglühtem Kaliumkarbonat. Nach dem Abdestillieren des Äthers und vollständigem Entfernen desselben durch gelindes Erwärmen bei vermindertem Druck blieb ein gelblich gefärbtes Öl von zedernartigem Geruch, das über Nacht beim Stehen im evakuierten Exsikkator über Schwefelsäure und Paraffin vollständig erstarrte. Die Ausbeute an dieser kristallisierten Substanz betrug 4 g, somit 53.7% der in bezug auf das verwendete Hydrazid theoretisch berechneten Menge. Das Produkt war in Äther, Alkohol, Benzol schon bei Raumtemperatur sehr leicht löslich und konnte aus diesen Lösungen selbst beim Abdunsten erst nach langem Stehen im Vakuum über Trockenmittel wieder kristallisiert erhalten werden. Nur mit Petroläther, worin die Substanz in der Wärme auch sehr reichlich löslich ist, erreichten wir, daß die durch Erwärmen unter Rückfluß möglichst gesättigte Lösung beim starken Abkühlen Kristalle abschied, wenn vorher der Petroläther mit geglühtem Kaliumkarbonat entwässert und dann frisch destilliert war. Die so erhaltenen Kristalle wurden mit gekühltem Petroläther gewaschen und im Vakuum über Paraffin neben konzentrierter Schwefelsäure getrocknet. Wir erhielten so würfelförmige Kristalle mit einem schwachen Stich ins Gelbe, die bei 41° schmolzen.

Für die Analyse wurden die Kristalle in der Reibschale zerrieben und mehrere Stunden im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure stehengelassen.

4·240 mg Substanz gaben 11·216 mg Kohlendioxyd und 3·053 mg Wasser  
4·996 mg „ „ 0·290 cm<sup>3</sup> Stickstoff bei 712 mm und 20°.

Ber. für C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>O<sub>2</sub>N: C 72·06, H 8·21, N 6·01 %.

Gef.: C 72·14, H 8·06, N 6·34 %.

Während EDGAR STEDMAN und GEORG BARGER den Schmelzpunkt des Indolinons bei 68° beobachteten, schmilzt unser synthetisch hergestelltes Indolinon bei 41°.

Um sicher zu sein, daß nicht etwa der zu nieder gefundene Schmelzpunkt durch Spuren eines zurückgehaltenen Lösungsmittels bedingt ist, haben wir das Indolinon unter vermindertem Druck destilliert und den Schmelzpunkt nach dem Impfen mit einer Spur des kristallisierten Indolinons und mehrtägigem Liegen im Vakuumexsikkator wieder geprüft, dabei abermals bei 40—41° gefunden. Da endlich auch wiederholte Darstellungen dieses Indolinons ein Produkt von gleichem Schmelzpunkt ergaben, liegt eine erhebliche Verschiedenheit dieser Indolinone vor, die voraussichtlich durch die in jüngster Zeit von ROBERT ROBINSON und dessen Mitarbeitern<sup>15</sup> begonnenen Versuche über die Synthese von Physostigmin (Eserin) aufgeklärt wird.

Um mehr als die Elementaranalyse und die Angaben der leichten Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln und über den Schmelzpunkt des 5-Äthoxy-1-methyl-3-methyl-3-äthyl-2-indolinons zur Charakterisierung dieser Verbindung geben zu können, fügen wir noch folgendes hinzu. Verteilt man etwas des Indolinons in heißem Wasser und fügt zu der mit öligen Tropfen durchsetzten Flüssigkeit tropfenweise Merkurichloridlösung zu, so fällt ein weißer Niederschlag, der bald zu feinen Kristallnadeln sich verdichtet, die, aus heißem Wasser umkristallisiert, bei langsamem Erhitzen bei 131° schmelzen.

**Bromprodukt.** Gibt man zur Lösung des Indolinons in Eisessig unter Schütteln Bromwasser, bis sie deutlich gelb bleibt, so fällt ein weißer, bald kristallinischer Niederschlag, der, aus verdünntem, heißem Alkohol umkristallisiert, farblose, verfilzte Nadeln bildet, die bei 115—116° schmelzen.

4·265 mg Bromprodukt gaben 2·588 mg Bromsilber.

Ber. für C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>NBr: Br 25·61 %.

Gef.: Br 25·82 %.

**Nitroprodukt.** Wird die Lösung des Indolinons in wenig Eisessig mit Salpetersäure 1·4 sp. G. versetzt und nach dem Er-

<sup>15</sup> Journ. Chem. Soc. London 1932, Part. I, S. 298; Part. II, S. 304; Part. III, S. 317; Part. IV, S. 321; Part. V, S. 326.



wärmen auf dem Wasserbade mit Wasser verdünnt, so fällt ein gelber Niederschlag, der nach dem Absaugen und Waschen beim Umlösen in warmem Alkohol gelbe Kristalle bildet, deren Schmelzpunkt bei 195° lag. Die Analyse wies darauf hin, daß ein Dinitroprodukt entstanden ist.

4.628 mg Substanz gaben 0.560 cm<sup>3</sup> Stickstoff bei 711 mm und 17°.

Ber. für C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>: N 13.01%.

Gef.: N 13.32%.

Schließlich wurde noch versucht, vom Indolinon durch Behandlung der alkoholischen Lösung mit metallischem Natrium zum entsprechenden Indolinol zu gelangen, wie dies sehr leicht beim 1-Methyl-3.3-Dimethyl-2-Indolinon<sup>16</sup> erreichbar ist.

2 g *p*-Äthoxy-1,3-dimethyl-3-äthyl-2-indolinon wurden in 40 cm<sup>3</sup> absolutem Alkohol gelöst, am Rückflußkühler zum Kochen gebracht und nach und nach 3 g Natrium eingetragen. Nach der vollständigen Lösung verdünnten wir mit kaltem Wasser und übersättigten unter guter Kühlung mit verdünnter Salzsäure. Die saure Lösung schüttelten wir mit Äther, wobei etwas unverändertes Indolinon in den Äther ging. Die saure, wässrige Lösung wurde unter Vermeidung einer Temperaturerhöhung nun mit Natronlauge übersättigt und wieder mit Äther ausgeschüttelt, um die durch die Hydrierung entstandene Base aufzunehmen. Nach dem Abdestillieren der vorher mit geglühtem Natriumsulfat getrockneten ätherischen Lösung blieb ein gelbes Öl, das nicht kristallisierte. Wir suchten es durch Wasserdampfdestillation dadurch zu reinigen, daß wir das anfangs übergehende Destillat preisgaben, da es etwas Alkohol und etwa eine Indolinbase enthalten konnte. Das später folgende Wasserdampfdestillat erst wurde wieder mit Äther ausgeschüttelt und lieferte nach dem Scheiden und Trocknen mit Natriumsulfat beim Abdestillieren des Äthers wieder ein schwach gelb gefärbtes Öl, das weder durch Reiben mit einem spitzen Glasstab und Stehen im evakuierten Exsikkator noch durch starke Abkühlung zur Kristallisation gebracht werden konnte. Da diese Base an der Luft sich allmählich dunkler gelb färbte und keine Ansätze der Kristallisation zeigte, verzichteten wir auf die Analyse und suchten durch Versetzen der ätherischen Lösung mit Tropfen von alkoholischer Schwefelsäure, mit einer alkoholischen Weinsäurelösung Salze kristallisiert zu erhalten. Es entstanden dadurch aber nur flüssige Abscheidungen, die sich an der Luft mehr und mehr dunkel färbten.

<sup>16</sup> G. CIAMICIAN und A. PICCININI, Ber. D. ch. G. 29, 1896, S. 2469.

Nur durch Vermischen der ätherischen Lösungen von der Base und von Pikrinsäure fiel sofort ein alsbald kristallisiertes Pikrat aus, das, auf der Saugplatte gesammelt und mit Äther gewaschen, nach dem Trocknen im Vakuumexsikkator bei 146—147° unter Braunfärbung schmolz.

Für die Analyse wurde es aus Benzol, dem eine Spur Pikrinsäure zugesetzt war, umkristallisiert. Der Schmelzpunkt des umkristallisierten Pikrates lag wieder bei 146° unter Braunfärbung und war bei langsamer Steigerung der Temperatur sogar bei 139° zu beobachten. Die Analyse weist darauf hin, daß sich die Base, wie eine Indoliumbase unter Austritt von Wasser mit Pikrinsäure nach der Gleichung zu einem Salz verbunden hat:  $C_{14}H_{21}O_2N + C_6H_3O_7N_3 = C_{20}H_{22}O_8N_4 + H_2O$ .

4.135 mg Pikrat gaben 0.484 cm<sup>3</sup> Stickstoff bei 719 mm und 21°.

Ber. für C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>N<sub>4</sub>: N 12.56%.

Gef.: N 12.86%.

Die schnelle Veränderung der Base beim Liegen an der Luft und erfolglose Versuche, etwa mit Rechtsweinsäure kristallisierte Salze zu gewinnen, ließ die von uns angestrebte Spaltung der Base, welche an der Stelle 3 der Konstitutionsformel ein asymmetrisches Kohlenstoffatom enthält, in die optischen Antipoden nicht erreichen.

---

Herr Prof. G. BARGER, Edinburgh, dem ich seinerzeit zum Vergleiche eine Probe unseres bei 41° schmelzenden synthetisch hergestellten Indolinons zugesendet hatte, teilte mir unlängst brieflich mit, daß Herr EDG. STEDMAN durch Reduktion dieses Indolinons eine Base erhielt, deren kristallisiertes Perchlorat identisch war mit dem Perchlorat des Indolinols, das von ihm aus *p*-Äthoxymethylphenylhydrazon des Methyläthylazetaldehydes durch die Einwirkung von alkoholischer Salzsäure gewonnen wurde.

Dieser Befund bringt eine willkommene Bestätigung der von uns angenommenen Formel des Indolinols und der Konstitution unseres bei 41° schmelzenden Indolinons, auf die hinzuweisen, mich Herr Prof. BARGER in einem Schreiben vom 7. Mai d. J. ermächtigt.

---



# Die Ultraviolett-Inaktivierung von Saccharase in ihrer Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration und dem Ozon

Von

GEORG GORBACH und HANS PICK

Aus dem Biochemischen Institut der Technischen Hochschule in Graz

Vorstand Prof. F. FUHRMANN

(Mit 3 Textfiguren)

(Vorgelegt in der Sitzung am 12. Mai 1932)

Es ist schon lange bekannt, daß kurzwellige Strahlen im allgemeinen auf Fermente hinderlich oder zerstörend wirken, eine Erscheinung, die in besonderem Maße auch für die Saccharase zutrifft. Es erschien uns nun für die Erklärung der Ultraviolett-inaktivierung der Saccharase im Sinne der modernen Ferment-auffassung überhaupt wünschenswert, die herrschenden Beziehungen zur Wasserstoffionenkonzentration und zum Ozon experimentell festzustellen.

## 1. Versuchstechnik.

Zur Darstellung der Enzympräparate verwendeten wir Bierhefe (Brauerei Reininghaus, Graz), die unter Toluolzusatz autolytisch wurde. Solche gealterte Autolysate wurden nun durch Fällung mit Essigsäure, Dialyse, Kaolin- und Tonerde C-Adsorption und schließlich Elution mit 0.5% sek. Kaliumphosphat oder 0.05%igem Ammoniak gereinigt<sup>1</sup>. Die als Dialysenmembran dienenden Rindsdärme mußten durch eine Vorbehandlung mit wenig wirksamen Enzymlösungen bis zur Absättigung der Adsorptionskräfte so präpariert werden, daß jede weitere Fermentanlagerung und damit verbundene Verluste vermieden sind. (Vgl. GORBACH und LERCH<sup>2</sup>.)

Die Feststellung der *enzymatischen Aktivität* wurde nach

<sup>1</sup> G. GORBACH und K. LERCH, Einfluß des ultravioletten Lichtes auf die Saccharase. I. Biochemische Zeitschrift 219, 1930, S. 127.

<sup>2</sup> G. GORBACH und K. LERCH, Einfluß des ultravioletten Lichtes auf die Saccharase. II. Biochemische Zeitschrift 235, 1931, S. 260.

der Methode von GORBACH<sup>3</sup> refraktometrisch unter den Bedingungen der Zeitwertsbestimmung durchgeführt. Als Maß für die Wirkung diente entweder der Zeitwert oder die Brechungsänderung in Refraktometerteilstrichen für 30 und 50 Minuten.

Als Lichtquelle für die Bestrahlungsversuche fand die Analysenquarzlampe der Firma Heraeus in Hanau (110 Volt, 4 Amp. Gleichstrom) Verwendung. Die Bestrahlungstechnik wurde in der früheren Art und Weise durchgeführt<sup>4</sup>. Als Bestrahlungsgefäße benützten wir flache Schalen, die in dünner Schicht mit der Enzymlösung gefüllt wurden. Zur Kühlung derselben wurden sie in eine zweite Tasse gestellt, welche mit Eiswasser gefüllt war. Der Durchmesser der Schalen betrug 10 cm, die Menge des Enzyms 5 cm<sup>3</sup>.

Für die Versuche über den Einfluß des  $p_H$ -Wertes der Enzymlösung wurden vier Schalen mit je 6 cm Durchmesser, beschickt mit den Enzymlösungen von verschiedenen  $p_H$ -Werten, gleichzeitig bestrahlt. Zur Erzielung einer gleichmäßigen Lichtwirkung wurde die große Kühlchale, in welche die kleinen Schalen eingestellt waren, ständig gedreht.

Für die Versuche unter Ausschaltung des Luftsauerstoffes benutzten wir die in Figur 1 schematisch dargestellte Apparatur: Zwei Quarzeprouvetten (Q) von 15 cm Länge, 2 cm lichter Weite und einer kugeligen Erweiterung von 4 cm im Durchmesser sind in eine mit Eis und Wasser gefüllte Schale (K) schräg eingestellt. Die Erweiterung dient zur Aufnahme des bei der Gasdurchleitung etwa auftretenden Schaumes der Enzymlösung. Den Verschuß bildet ein doppelt durchbohrter Kautschukstopfen. Durch die eine Bohrung wird ein bis zum Boden reichendes, durch die zweite ein kurzes Kapillarrohr eingeführt.  $T_1$  und  $T_2$  sind Blasenähler, welche einerseits das Kontrollieren des Gasstromes und anderseits den luftdichten Abschluß der Eprouvetten gestatten. Die Blasenähler wurden mit Wasser gefüllt. Die Sauerstoff- bzw. Stickstoffzufuhr erfolgt bei  $T_1$ , während das Gas bei  $T_2$  nach dem Durchströmen der Enzymlösung die Apparatur verläßt. Für jeden Versuch verwendeten wir 5 cm<sup>3</sup> Enzymlösung. Der Gasstrom wurde bei beiden Versuchen mit Hilfe von Schraubenquetsch-

<sup>3</sup> G. GORBACH, Über die Verwendbarkeit des Zeißschen Eintauchrefraktometers zur Messung der Saccharasewirkung. Biochemische Zeitschrift 217, 1930, S. 440.

<sup>4</sup> G. GORBACH und K. LERCH, Biochemische Zeitschrift 219. 1930, S. 129.



hähnen derart gedrosselt, daß durch die Blasenähler durchschnittlich 60 Gasblasen in der Minute liefen.

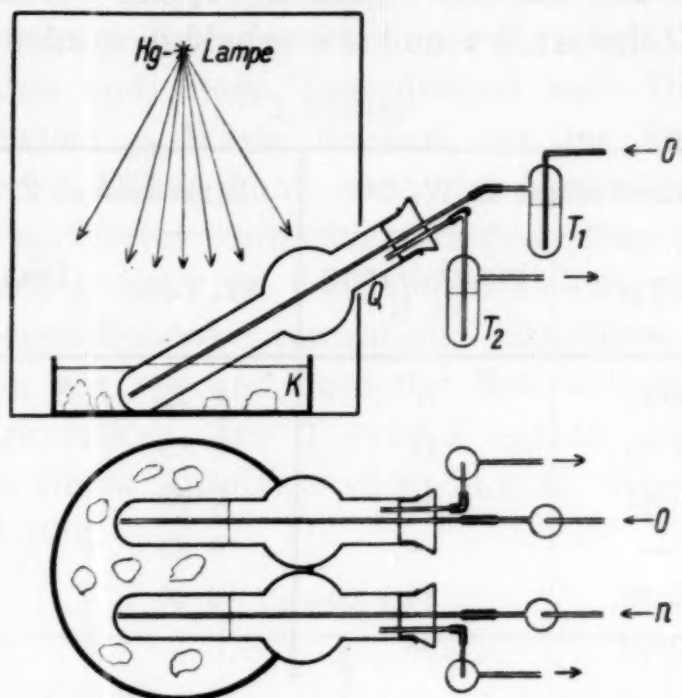


Fig. 1.

Die Messung des  $p_H$ -Wertes wurde kolorimetrisch innerhalb des  $p_H$ -Bereiches 3—8.4 nach MICHAELIS und bei den stark alkalischen Lösungen mit der Tropfenmethode nach TÖDT ausgeführt. Die Einstellung eines bestimmten  $p_H$ -Wertes bewerkstelligten wir durch Zusätze verdünnter Salzsäure und Natronlauge. Um die Konzentration der Enzymlösung in allen Fällen gleichzuhalten, wurden für jeden Versuch  $10\text{ cm}^3$  Enzymlösung verwendet, auf den  $p_H$ -Wert eingestellt und dann im Meßkölbchen auf  $20\text{ cm}^3$  aufgefüllt.

## 2. Versuchsreihen.

### A. Zeitlicher Inaktivierungsverlauf.

Im folgenden sind die Versuchsserien mitgeteilt, welche den Einfluß der Bestrahlungszeit auf verschieden reine Enzympräparate darlegen. Die anfänglichen Versuche führten wir mit gealterten Hefeautolysaten aus. Unter den angegebenen Bestrahlungsbedingungen konnte selbst nach zweistündiger Bestrahlung kaum eine Inaktivierung beobachtet werden. Erst die daraus durch Dialyse und Adsorption an Kaolin und Tonerde C gewonnenen Eluate zeigten eine starke Beeinflußbarkeit durch ultraviolettes Licht. Berücksichtigt man die Konzentration der Enzymlösung, so hat eine Bestrahlung von 80 Minuten eine Schädigung

von 90% herbeigeführt. Viel intensiver ist die Wirkung des ultravioletten Lichtes auf Saccharaselösungen von noch höherem Reinheitsgrad. Die Tabelle 1 gibt die Werte wieder, welche mit Eluaten vom Zeitwert 5.9 und 4.8 erhalten worden sind.

Tabelle 1.

Bestr.-Zeit in Minuten	Tonerdeeluat Z. W. 5.9		Tonerdeeluat Z. W. 4.8	
	Sk. T./60'	Inaktivierung in %	Sk. T./60'	Inaktivierung in %
0	1.44	0	1.75	0
5	0.85	41	0.85	51
10	0.67	54	0.65	68
15	—	—	0.20	88
25	0.23	84	0.00	100
35	0.02	98	—	—

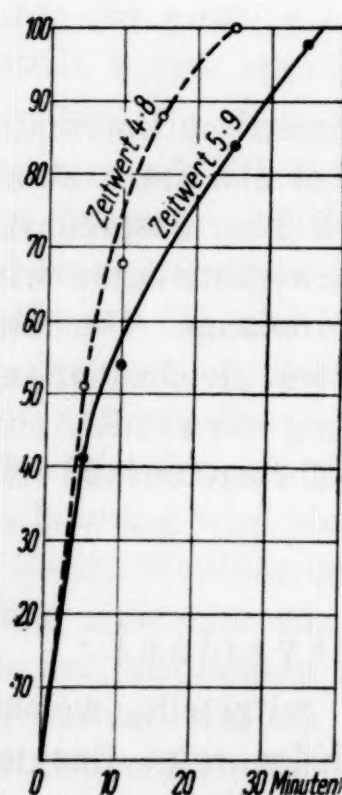


Fig. 2.

Es ergibt sich daraus, daß bei diesen Lösungen eine Bestrahlungszeit von 35 bzw. 25 Minuten genügt, um eine völlige Zerstörung der Wirkung herbeizuführen. Über den Zusammenhang der Inaktivierung mit der Bestrahlungsdauer orientieren die aus den Werten der Tabelle 1 konstruierten Kurven der Fig. 2. Die Inaktivierung verläuft zu Beginn der Bestrahlung unabhängig vom Reinheitsgrad linear. Nach längerer Bestrahlung erscheint die photochemische Reaktion verzögert. Die zerstörten Enzymkomplexe wirken scheinbar als Schutzsubstanzen, welche die weitere Inaktivierung der Lösungen erschweren. Im allgemeinen zeigen Kurven von weniger reinen Präparaten einen Verlauf, wie ihn monomolekulare Reaktionen aufweisen.

#### B. $p_H$ -Wert und Bestrahlungsinaktivierung.

Die folgenden Versuche geben über die Abhängigkeit der Inaktivierung vom  $p_H$ -Wert der Enzymlösung Aufschluß. Zur Bestimmung der Wirkung wurde bei diesen Versuchen statt eines 16%igen ein 8%iger Rohrzuckergehalt verwendet. Für einen Ver-



suchsansatz von 50 cm<sup>3</sup> gebrauchten wir 5 cm<sup>3</sup> der Enzymlösung. Im übrigen wurden die Bedingungen der Zeitwertsbestimmung eingehalten. Die Versuche führten wir mit einem gealterten, durch fraktionierte Autolyse gewonnenen Autolysat, mit verschiedenen Dialysaten und einem Tonerdeeluat aus. Die in den Tabellen angegebenen  $p_H$ -Werte wurden vor der Bestrahlung bestimmt. In vielen Fällen kann nach der Bestrahlung eine Verschiebung des  $p_H$ -Wertes beobachtet werden. Dies gilt besonders für den alkalischen Ast. Sie verschieben sich in das Gebiet der höheren Wasserstoffionenkonzentration. Sämtliche Enzymlösungen überprüften wir vor und nach der Bestrahlung auf ihre enzymatische Wirksamkeit. Die Tabelle 2 enthält die Ergebnisse, welche wir mit einem Autolysat (0.80 Skt/30', Trockenrückstand 0.1 g/cm<sup>3</sup>) erhielten.

Tabelle 2.

Enzym	Anfangs- $p_H$ =	4.4	5.9	7.3	7.8
Autolysat	Wkg. vor Bestrahlung in Sk. T./80'.....	0.67	0.79	0.75	0.69
	Wkg. nach 60'-Bestrahlung in Sk. T./30'.....	0.67	0.73	0.74	0.69
	Inaktivierung in % ...	0	0.70	0	0

Trotz zweistündiger Bestrahlung konnte kaum eine Inaktivierung durch das kurzwellige Licht festgestellt werden. An diesem Ergebnis ändert auch der wechselnde  $p_H$ -Wert nichts, wenn man von der geringen Schwächung bei  $p_H$  5.9 absieht. Wesentlich anders wird das Ergebnis, wenn statt der Autolysate Dialysate versucht werden.

Tabelle 3.

Enzym	Anfangs- $p_H$ =	3.2	7	8.2	9.2
Dialysat 24 Std.	Wkg. vor Bestrahlung in Sk. T./30'.....	0.67	0.80	0.62	0.59
	Wkg. nach 60'-Bestrahlung in Sk. T./30'.....	0.31	0.45	0.25	0.30
	Inaktivierung in % ...	54	44	60	49

Wie Tabelle 3 zeigt, wird das aus dem Autolysat der Tabelle 2 erhaltene 24stündige Dialysat bei einer Bestrahlungszeit von nur 60 Minuten bereits um durchschnittlich 50% geschädigt. Die Abhängigkeit der Inaktivierung von der H-Konzentration ist jedoch klein. Trotz der großen Aziditätsunterschiede waren die Werte ziemlich ähnlich. Die geringste Schädigung zeigte die neutrale Enzymlösung, während bei der Bestrahlung von sauren und alkalischen Enzymlösungen etwas höhere Werte erhalten wurden. Prinzipiell dasselbe Ergebnis lieferte ein 24stündiges Dialysat, welches von einem gealterten Autolysat stammte. Tabelle 4 zeigt die Resultate dieses Versuches.

Tabelle 4.

Enzym	Anfangs- $p_H =$	3·0	7·0	8·4	9·3
Dialysat 24 Std.	Wkg. vor Bestrahlung in Sk. T./50'.....	0·61	0·60	0·59	0·56
	Wkg. nach 60'-Bestrahlung in Sk. T./50'.....	0·29	0·31	0·25	0·12
	Inaktivierung in % ...	53	49	58	79

Die Schädigung ist bei  $p_H$  7 am geringsten. Auffallend erscheint die starke Inaktivierung bei  $p_H$  9·3. Auch der dritte in Tabelle 5 wiedergegebene Parallelversuch bestätigt diese Befunde.

Tabelle 5.

Enzym	Anfangs- $p_H =$	3·9	5·4	7·3	8·4
Dialysat 24 Std.	Wkg. vor Bestrahlung in Sk. T./50'.....	0·60	0·52	0·51	0·51
	Wkg. nach 60'-Bestrahlung in Sk. T./50'.....	0·27	0·25	0·26	0·18
	Inaktivierung in % ...	55	52	49	65

Das Dialysat der letzten Versuchsreihe wurde durch Adsorption an Tonerde unter Zusatz von 40% Azeton weiter gereinigt. Das erhaltene Eluat hatte einen sehr guten Zeitwert (1·27) und war durchschnittlich zwölfmal reiner als das Dialysat. Die damit erhaltenen Versuchsergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt.



Tabelle 6.

Enzym	Anfangs- $p_H$ =	5.5	6.9	8.4	9.0
Tonerdeeluat	Wkg. vor Bestrahlung in Sk. T./30' .....	0.68	0.70	0.73	0.67
	Wkg. nach 60'-Bestrah- lung in Sk. T./30' .....	0.44	0.40	0.43	0.41
	Inaktivierung in % ...	35	43	41	39

Trotz des hohen Reinheitsgrades wird diese Enzymlösung bei gleicher Bestrahlungszeit (60') nur um zirka 40% geschädigt. Die Abhängigkeit vom  $p_H$ -Wert ist dabei sehr gering, denn man erhält nur wenig differierende Werte.

C. Ozonversuche.

Eine Reihe von Untersuchungen haben wir der Lösung der Frage gewidmet, ob das bei der Bestrahlung mit der Quarzlampe auftretende Ozon die Zerstörung der enzymatischen Wirkung zur Folge hat oder ob es sich dabei um eine direkte Einwirkung kurzwelliger Strahlen auf das Enzym selbst handelt. Durch Vorversuche wurde die Einwirkung von ozonisiertem Sauerstoff auf Saccharasepräparate studiert. Als Enzymlösung stand uns ein durch Adsorption an Kaolin vorgereinigtes Tonerdeeluat vom Zeitwert 4.7 zur Verfügung. Zur Ausführung dieses Versuches füllten wir zwei Eprouvetten mit gleichem Durchmesser mit 5 cm<sup>3</sup> Eluat. In die eine Eprouvete wurde mit Hilfe des SIEMENSschen Ozonisators ozonisierter Sauerstoff, in die zweite molekularer Sauerstoff eingeleitet.

Bereits nach einer zwei Minuten dauernden Einleitung sind 90% der ursprünglichen Wirkung verlorengegangen. Eine Durchleitungszeit von 4 Minuten genügt, um das Präparat völlig zu inaktivieren. Im Parallelversuch mit molekularem Sauerstoff bleibt die Wirkung während dieser Zeit erhalten. Ozon ist nach diesen Versuchen tatsächlich geeignet, starke Inaktivierungen herbeizuführen, was mit den bezüglichen Untersuchungen SVANBERG<sup>5</sup> im Einklang steht.

Um die Wirkung des Ozons mit Sicherheit auszuschalten, wurden die folgenden Versuche unter Einleiten von Stickstoff

<sup>5</sup> O. SVANBERG, Archiv for Kemi 8, 1921.

während der Bestrahlung durchgeführt. Um aber die Wirkung des eventuell gebildeten Ozons zu erkennen, leiteten wir in einer Parallelprobe während der Bestrahlung reinen Sauerstoff zu. Für diese Versuche wurde das Eluat vom Zeitwert 4·7 verwendet, welches sich nach den oben mitgeteilten Versuchen gegen Ozon als sehr empfindlich erwies. Vor dem Beginn der Durchstrahlung wurden die beiden Gase fünf Minuten hindurch in die Proben eingeleitet, um die Luft zu entfernen. Zur Bestrahlung kamen je 5 cm<sup>3</sup> der Enzymlösung. Nach bestimmten Bestrahlungszeiten wurden die Proben untersucht und durch neue ersetzt. Die auf diesem Wege erhaltenen Versuchsergebnisse sind in der Tabelle 7 (Versuch I und II) enthalten.

Tabelle 7.

Versuch	Enzym	Bestrahlungszeit in Minuten	0	10	20	30	50
I	Tonerdeeluat	Stickstoffversuch: Wkg. in Sk. T./60'	0·91	0·92	0·47	0·31	0·10
		Sauerstoffversuch: Wkg. in Sk. T./60'	0·91	0·95	0·69	0·49	0·16
II	Tonerdeeluat	Stickstoffversuch: Wkg. in Sk. T./60'	0·93	0·83	0·69	—	0·39
		Sauerstoffversuch: Wkg. in Sk. T./60'	0·93	1·02	0·79	—	0·65

Die auf Grund dieser Werte konstruierten Kurven der Figur 3 zeigen deutlich, daß die Inaktivierung der Saccharase durch kurzwelliges Licht auch unter vollkommenem Sauerstoffabschluß bewirkt wird.

Sie ist sogar stärker als im Parallelversuch mit reinem Sauerstoff, bei welchem optimale Bedingungen zur Bildung des Ozons durch ultraviolettes Licht geschaffen erscheinen. Es tritt in diesem Falle sogar eine geringe Erhöhung der Enzymwirkung nach 10 Minuten dauernder Bestrahlung ein. Um Zufallsergebnisse auszuschalten, wiederholten wir die Versuchsreihe. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 7 verzeichnet. Wie die daraus erhaltenen Kurven aber zeigen (Fig. 3), erhält man ein ähnliches Bild. Wiederum erscheint die stickstoffgesättigte Probe in der Zeiteinheit stärker geschädigt als die sauerstoffgesättigte. Die beobachtete Aktivierung der sauerstoffgesättigten Probe nach



einer Bestrahlung von 10 Minuten tritt in diesem Versuch noch bedeutend stärker hervor. Es wurde nicht verabsäumt, den von der Probe während der Bestrahlung abziehenden Sauerstoff auf Ozon zu prüfen. Die Jodkaliumstärkeprobe fiel in jedem Zeitpunkt der Bestrahlung negativ aus. Zur Erklärung der Erscheinung, daß Bestrahlungen in Sauerstoffatmosphäre sogar eine

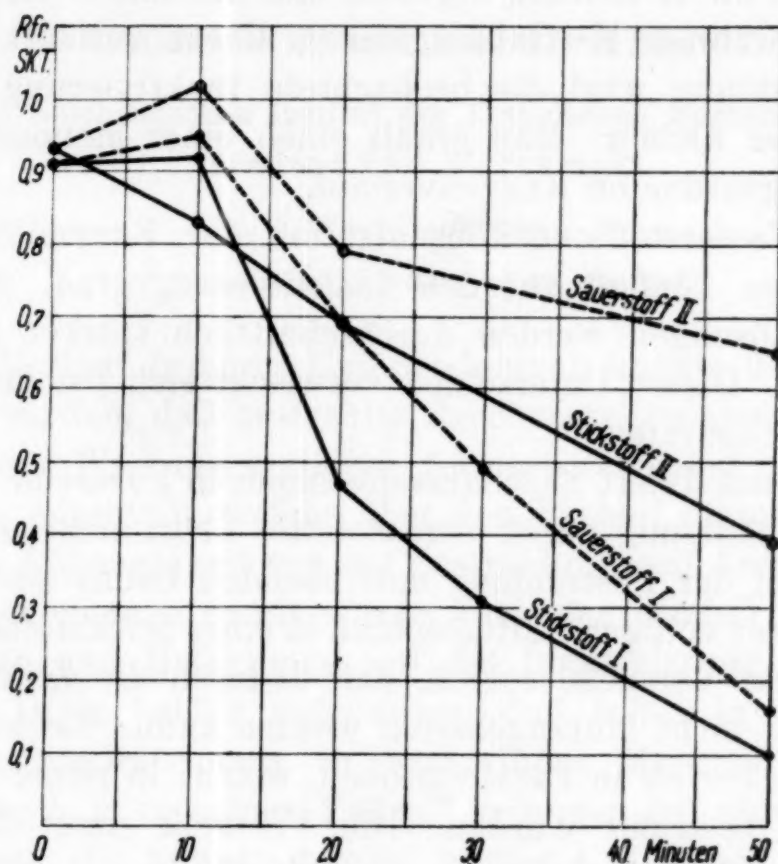


Fig. 3.

Aktivierung der Enzymlösung herbeiführen, kann die Annahme dienen, daß die neben der enzymatisch wirkenden Substanz vorhandenen Hemmstoffe durch den aktivierten Sauerstoff oxydiert und dadurch unschädlich werden. Mit dieser Annahme steht die beobachtete Inaktivierung bei Verlängerung der Bestrahlungszeit durchaus nicht im Widerspruch. Denn selbst dann wird die Zerstörung des Enzymkomplexes durch die Oxydation der Begleitsubstanzen teilweise kompensiert, nur überwiegt die Inaktivierung der zymoaktiven Substanz die durch Entfernung der hemmenden Begleitstoffe bewirkte Aktivierung.

### Zusammenfassung.

Aus den mit Saccharasepräparaten angestellten Bestrahlungsversuchen geht hervor, daß der Reinheitsgrad der Enzym-

lösung für die Wirkung ultravioletter Strahlung von ausschlaggebender Bedeutung ist. Während Hefeautolysate selbst nach zweistündiger Bestrahlung kaum geschädigt erscheinen, haben Präparate von hohem Reinheitsgrad schon nach 20—30 Minuten die Wirkung verloren.

Hinsichtlich der Abhängigkeit dieser Inaktivierung von der Zeit hat sich die Beziehung ergeben, daß die Inaktivierungskurve bei kurz gewählten Bestrahlungszeiten linear verläuft. Bei längerer Bestrahlung wird die beobachtete Inaktivierung pro Zeiteinheit immer kleiner. Man erhält einen einer monomolekularen Reaktion zugeordneten Kurvenverlauf.

Die Wasserstoffionenkonzentration der Enzymlösungen ist von geringem Einfluß auf den Inaktivierungsgrad. Saure und alkalische Lösungen werden durchschnittlich stärker inaktiviert als neutrale. Dieser Unterschied verwischt sich bei den reinsten Saccharasepräparaten.

Ozon inaktiviert Saccharaselösungen in kürzester Zeit. Doch kann die Schädigung durch ultraviolettes Licht nicht auf die Wirkung des bei der Bestrahlung entstehenden Ozons zurückgeführt werden. Unter völligem Luftabschluß in einer Stickstoffatmosphäre durchgeführte Versuche zeigen, daß dadurch die Zerstörung der Wirksamkeit nicht hintangehalten werden kann. Sie ist sogar bedeutend stärker als in Parallelproben, welche in reiner Sauerstoffatmosphäre bestrahlt wurden. Die Versuche unter Zufuhr von molekularem Sauerstoff führten nach 10 Minuten der Bestrahlung sogar zu einer Aktivierung der Saccharasepräparate. Diese Beobachtung wird mit der Annahme erklärt, daß der durch ultraviolettes Licht aktivierte Sauerstoff die wirkungshemmenden Begleitstoffe des Enzyms oxydiert und sie dadurch unschädlich macht.

Nach diesen Ergebnissen erfolgt die Inaktivierung durch die Aufnahme der Lichtenergie von der enzymatischen Substanz selbst oder über die sie notwendig begleitenden Stoffe. Es kann sich bei der Wirkung des Ozons höchstens um eine Nebenerscheinung handeln.



# Die Nachinaktivierung bestrahlter Saccharaselösungen und der Einfluß zugesetzten Tryptophans und Hefegummis

Von

GEORG GORBACH und D. KIMOVEC

Aus dem Biochemischen Institut der Technischen Hochschule in Graz

Vorstand Prof. F. FUHRMANN

(Mit 3 Textfiguren)

(Vorgelegt in der Sitzung am 12. Mai 1932)

Im Verlauf früherer Untersuchungen konnte des öfteren beobachtet werden, daß bestrahlte Saccharaselösungen beim Stehen ihre restliche Wirkung verlieren. Im nachstehenden sind Versuchsergebnisse mitgeteilt, welche über den Verlauf dieser Nachinaktivierung in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit Aufschluß geben. Im Zusammenhange damit wurde auch der Einfluß studiert, den Tryptophan und Hefegummi auf die Inaktivierung beim Stehen ausüben. Diese beiden Substanzen sind selbst in den reinsten Hefesaccharasepräparaten in wechselnden Mengen zu finden<sup>1</sup>, wenn es auch in einzelnen Fällen<sup>2</sup> gelungen ist, eine von beiden abzutrennen. Es konnte gezeigt werden<sup>3</sup>, daß der Tryptophangehalt in den Präparaten bei der Reinigung ansteigt und bei der Dialyse mit dem Ansteigen und Abfallen der Wirksamkeit mitgeht. Dies legt die Vermutung nahe, daß Tryptophan und Hefegummi für die Wirkung nicht bedeutungslos sind, sondern nach modernen Vorstellungen<sup>4</sup> über das Wesen des Enzyms als Träger für die enzymatische Substanz wirken. Aus diesen Gründen war der Einfluß dieser beiden Körper auf die Nachinaktivierung von Interesse.

## Versuchsmethodik.

### Hinsichtlich der Darstellung der Saccharasepräparate und

<sup>1</sup> H. EULER und K. JOSEPHSON, Ber. D. ch. G. 57, 1924, S. 859.

<sup>2</sup> R. WILLSTÄTTER, K. SCHNEIDER und E. BAMANN, Z. physiol. Chem. 142, 1925, S. 248; R. WILLSTÄTTER und K. SCHNEIDER, Z. physiol. Chem. 142, 1925, S. 257.<sup>1</sup>

<sup>3</sup> G. GORBACH und K. LERCH, Biochem. Ztschr. 235, 1931, S. 259.

<sup>4</sup> A. FODOR, Das Fermentproblem. II. Aufl. Steinkopf 1929.

der Bestrahlung wurde die Versuchstechnik der früheren Mitteilungen<sup>5</sup> beibehalten. Die Wirksamkeit stellten wir refraktometrisch<sup>6</sup> unter den Bedingungen der Zeitwertsbestimmung nach O. SULLIVAN und THOMPSON<sup>7</sup> fest. Für 50 cm<sup>3</sup> 16%iger Rohrzuckerlösung wurden in jedem Falle 2·5 cm<sup>3</sup> Enzymlösung verwendet. Zur Vereinfachung der Meßmethode wurde nicht der Zeitwert, sondern die Änderung des Brechungsexponenten während der Rohrzuckerspaltung in 30 Minuten bestimmt. Die in den Tabellen angegebenen Zahlen stellen diese Änderung in Refraktometerteilstrichen (Sk. T.) vor. Das für die Versuche benötigte Tryptophan bezogen wir von der Firma Merck. Das Hefegummi wurde nach den Vorschriften von SALKOWSKI aus Bierhefe gewonnen. Von diesen Substanzen wurden 0·2%ige Lösungen hergestellt und davon 10 cm<sup>3</sup> der gleichen Menge bestrahlter Enzymlösung zugemischt, so daß die endgültige Konzentration des Tryptophans bzw. des Hefegummis in der Mischung 0·1% betrug. Als Kontrollösung diente eine auf das Doppelte verdünnte bestrahlte Enzymlösung. Die Wirkung dieser drei Lösungen wurde sofort und nach 6, 24, 48 und 96 Stunden nach der Bestrahlung ermittelt.

#### Versuchsergebnisse.

Für die Untersuchung der Nachaktivierung diente als Enzympräparat ein Tonerdeeluat, welches bei einem Trockenrückstand von 1·5 mg/cm<sup>3</sup> die Wirksamkeit von 0·36 Sk. T. in 30 Minuten aufwies. Es war aus einem mehrere Monate alten Hefeautolysat durch Essigsäurefällung, Dialyse, Adsorption an Tonerde C und nachfolgende Elution mit verdünntem Ammoniak erhalten worden. Seine Reaktion entsprach  $p_H = 9·6$ . Das Eluat wurde in Mengen von je 10 cm<sup>3</sup> während 5, 10, 20 und 40 Minuten mit der Quarzlampe bestrahlt und die Wirkung sofort nach der Bestrahlung und nach 6, 24, 48 und 96 Stunden bestimmt. Die auf diese Weise erhaltenen Versuchsergebnisse sind in der Tabelle 1 enthalten. Die prozentuelle Inaktivierung wurde unter Zugrundelegung der Wirksamkeit des unbestrahlten Eluates errechnet. Mit Hilfe dieser Werte ist in Fig. 1 der Inaktivierungsverlauf der verschieden lang bestrahlten Enzymlösungen graphisch dargestellt. Unmittelbar nach der Bestrahlung erhält man einen, monomolekularen Re-

<sup>5</sup> G. GORBACH, Biochem. Ztschr. 217, 1930, S. 440.

<sup>6</sup> G. GORBACH und K. LERCH, Biochem. Ztschr. 219, 1930, S. 122.

<sup>7</sup> O. C. SULLIVAN und F. W. THOMPSON, Journ. Chem. Soc. London 57, 1890, S. 834.



aktionen ähnlichen Kurvenverlauf, was mit früheren Beobachtungen<sup>8</sup> übereinstimmt. Die 40 Minuten dauernde Bestrahlung hatte einen Rückgang der Wirksamkeit auf 36% des ursprünglichen Wertes zur Folge.

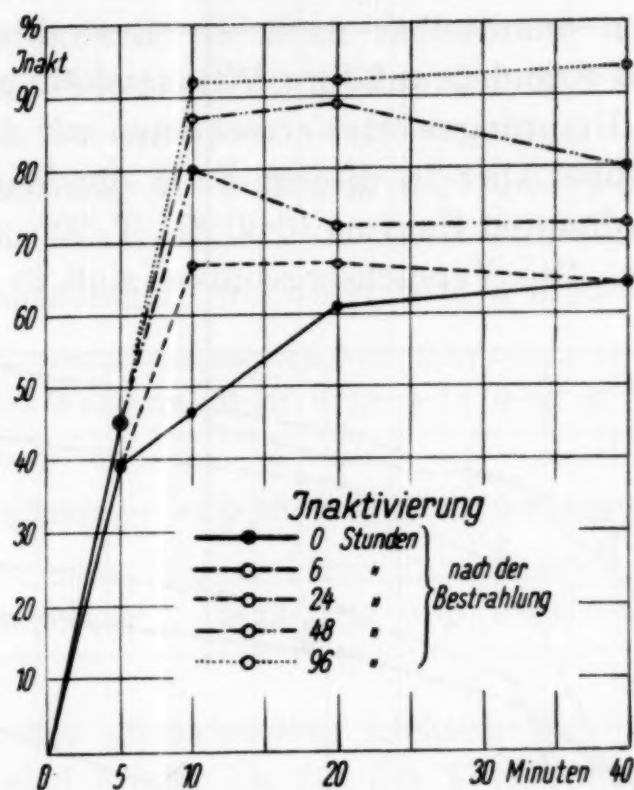


Fig. 1.

Tabelle 1.

Bestrah- lungszeit in Minuten	Wirksamkeit in Sk. T./30' nach:					Ber. Inaktivierung in % nach:				
	0h	6h	24h	48h	96h	0h	6h	24h	48h	96h
0	0·36	0·36	0·36	0·36	0·36	0	0	0	0	0
5	0·22	0·22	0·20	0·20	0·20	39	39	45	45	45
10	0·19	0·12	0·07	0·05	0·03	47	67	80	87	92
20	0·14	0·12	0·10	0·04	0·03	61	67	72	89	92
40	0·13	0·13	0·10	0·07	0·02	64	64	72	80	94

Für die Versuche unter Zusatz von Tryptophan und Hefegummi stand uns ebenfalls ein Ammoniakeluat aus Tonerde C mit einer Wirksamkeit von 0·37 Sk. T./30' und einem Trockenrückstand von 1 mg/cm<sup>3</sup> zur Verfügung. Die Wasserstoffionenkonzen-

<sup>8</sup> G. GORBACH und H. PICK, Monatsh. Chem. 61, 1932, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 141, 1932.

tration des Eluates entsprach  $p_H = 9.6$ . Je  $30\text{ cm}^3$  dieses Eluats wurden durch 30 und 60 Minuten bestrahlt und davon dann je  $10\text{ cm}^3$  mit der gleichen Menge Wasser, Tryptophan und Hefegummilösung versetzt. Die nur mit Wasser verdünnte Enzymlösung diente als Kontrollösung. Die auf diese Weise erhaltenen Lösungen wurden unmittelbar nach der Bestrahlung und nach 6, 24, 48 und 96 Stunden auf ihre Wirksamkeit geprüft. Unter Verwendung des Ursprungswertes errechneten wir die prozentuelle Inaktivierung, wobei aber in diesem Falle die Wirkung des auf das Doppelte verdünnten Enzyms ( $0.30\text{ Sk. T./30'}$ ) als Rechnungsgrundlage diente. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 2 zu-

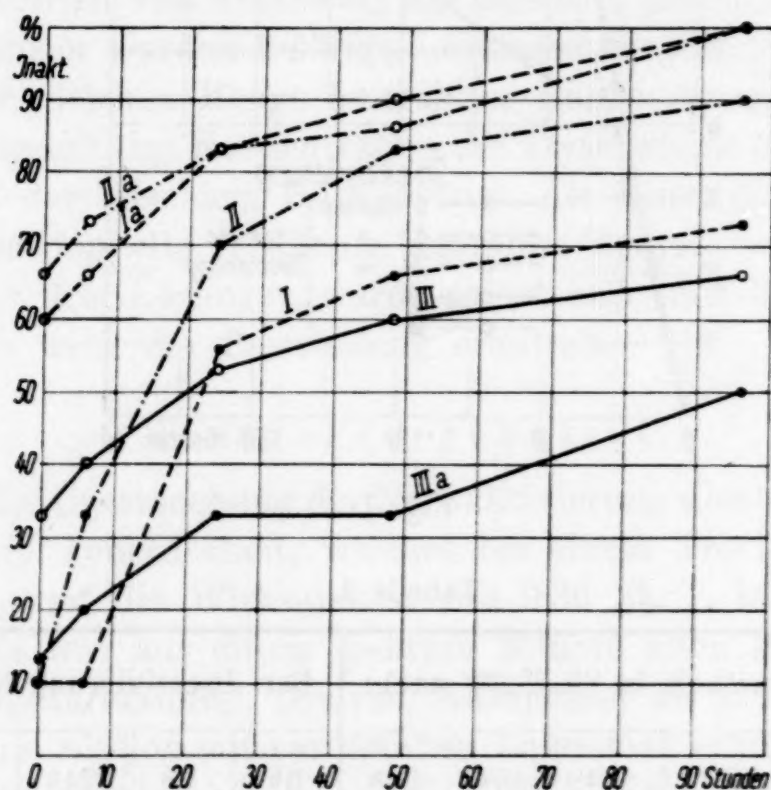


Fig. 2.

sammengefaßt. Fig. 2 gibt diese Resultate in graphischer Darstellung wieder, wobei die Kurven I und Ia den mit Tryptophan versetzten und 30 bzw. 60 Minuten bestrahlten Enzymgemischen, II und IIa den ebenso lange bestrahlten Hefegummiprüben und endlich III und IIIa den gleich behandelten zusatzfreien Enzymlösungen entsprechen.

Übereinstimmend mit den früheren Befunden nimmt die Wirkung beim Stehen nach der Bestrahlung langsam ab. Nach 96 Stunden hat die durch 30 Minuten bestrahlte Lösung 27%, die durch 60 Minuten bestrahlte 33% ihrer restlichen Wirkung verloren. Der Zusatz von Hefegummi und Tryptophan verstärkt diese



Tabelle 2.

	$p_H = 9.6$ 10 cm <sup>3</sup> bestr. Eluat + 10 cm <sup>3</sup>	Wirksamkeit in Sk. T./30' nach					Ber. Inaktivierung in %				
		0h	6h	24h	48h	96h	0h	6h	24h	48h	96h
Bestrahlungszeit 30'	destilliertes Wasser..	0.26	0.24	0.20	0.20	0.15	13	20	33	33	50
	Hefegummilösung ...	0.27	0.20	0.09	0.05	0.03	10	33	70	83	90
	Tryptophanlösung ..	0.27	0.27	0.13	0.10	0.08	10	10	56	66	73
Bestrahlungszeit 60'	destilliertes Wasser..	0.20	0.18	0.14	0.12	0.10	33	40	53	60	66
	Hefegummilösung ...	0.10	0.08	0.05	0.04	0.00	66	73	83	86	100
	Tryptophanlösung ..	0.12	0.10	0.05	0.03	0.00	60	66	83	90	100

Nachwirkung des ultravioletten Lichtes. Der Einfluß des Hefegummi ist dabei größer als der des Tryptophans. Dieser Unterschied tritt besonders deutlich bei der durch 30 Minuten bestrahlten Lösung hervor. Nach 96 Stunden erscheint die zusatzfreie Enzymlösung um 50%, die Enzymlösung mit Tryptophan um 73% und jene mit Hefegummi um 90% geschädigt. Die durch 60 Minuten bestrahlte Lösung zeigt bedeutend geringere Unterschiede, denn nach 96 Stunden ist sowohl das mit Tryptophan als auch das mit Hefegummi versetzte Enzympräparat unwirksam geworden. Dafür setzt aber die alleinige Zugabe dieser Substanzen unmittelbar nach der Bestrahlung die Wirkung wesentlich herab. Die Einbuße an Wirksamkeit beträgt bei Tryptophan 27%, bei Hefegummi 33%. Diese Erscheinung wurde bei der durch 30 Minuten bestrahlten Enzymlösung nicht beobachtet.

Beim Versetzen der durch 60 Minuten belichteten schwach gelb gefärbten Enzymlösung mit Tryptophan verfärbte sie sich und wurde braun. Diese Braunfärbung erhält man auch bei der direkten Bestrahlung von reinen Tryptophanlösungen. Anfänglich führten wir diese Veränderung des Tryptophans auf die alkalische Reaktion des Eluats zurück und wiederholten deshalb die Versuchsreihe mit einem durch verdünnte Salzsäure neutralisierten Eluat. Die Resultate dieser Versuche sind in der Tabelle 3 nieder-

Tabelle 3.

	$p_H = 7.0$ 10 cm <sup>3</sup> bestr. Eluat + 10 cm <sup>3</sup>	Wirksamkeit in Sk. T./30' nach					Ber. Inaktivierung in %				
		0h	6h	24h	48h	96h	0h	6h	24h	48h	96h
Bestrahlungszeit 30'	destilliertes Wasser..	0.25	0.24	0.19	0.17	0.10	16	20	36	43	66
	Hefegummilösung...	0.23	0.16	0.12	0.10	0.07	23	46	60	66	76
	Tryptophanlösung ..	0.23	0.19	0.15	0.10	0.09	23	36	50	66	70
Bestrahlungszeit 60'	destilliertes Wasser..	0.17	0.15	0.10	0.08	0.05	43	50	66	73	83
	Hefegummilösung...	0.12	0.12	0.05	0.02	0.00	60	60	83	93	100
	Tryptophanlösung ..	0.12	0.11	0.09	0.05	0.00	60	63	70	83	100

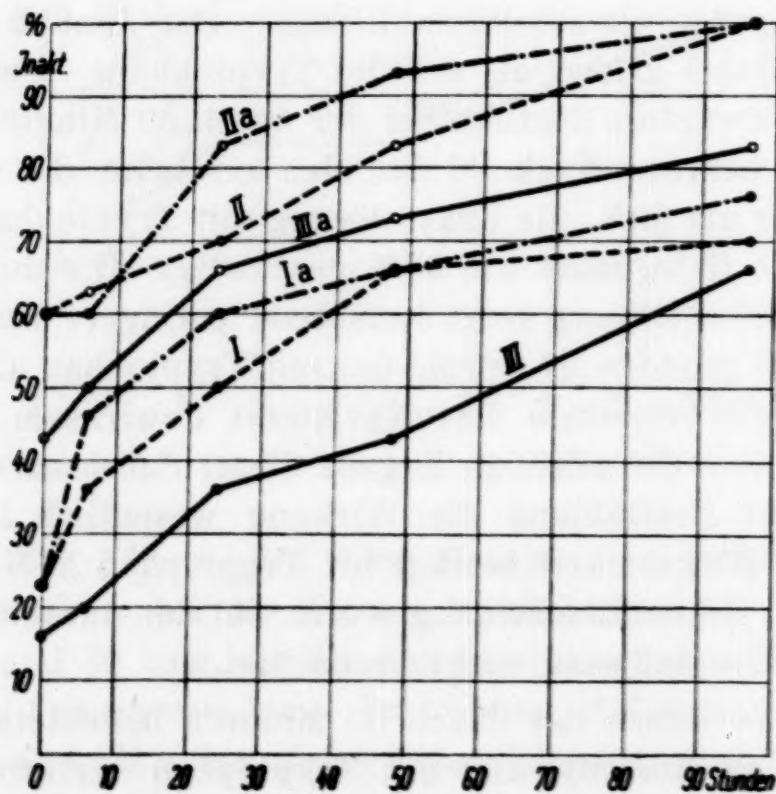


Fig. 3.

gelegt und in Fig. 3 graphisch ausgewertet. I und Ia entsprechen 30 bzw. 60 Minuten belichteten, mit Tryptophan versetzten Enzymlösungen, II und IIa mit Hefegummi gemischten Proben und III und IIIa den ebenso bestrahlten Kontrollen.



In Übereinstimmung mit dem früheren Versuch wirkt auch beim neutralisierten Eluat Hefegummi stärker inaktivierend als Tryptophan. Trotz der Neutralisation tritt die Braunfärbung beim Zumischen der Tryptophanlösung auf, womit eine Inaktivierung der Enzymlösung einhergeht, gleichgültig, ob eine durch 30 oder 60 Minuten bestrahlte Enzymlösung Verwendung findet. Sie beträgt im ersteren Fall 7%, im letzteren 17%.

Aus beiden Versuchsreihen geht hervor, daß es unter diesen Versuchsbedingungen durch Zusatz von Tryptophan und Hefegummi nicht gelingt, eine Reaktivierung bestrahlter Saccharasepräparate zu erzielen oder die Nachinaktivierung hintanzuhalten. Es wird im Gegenteil eine Inaktivierung des Enzyms herbeigeführt. Die Veränderung der Farbe beim Zumischen des Tryptophans weist darauf hin, daß die bei der Bestrahlung entstandenen Zerfallsprodukte mit dem Tryptophan in Reaktion treten. Das veränderte Tryptophan ist nicht mehr geeignet, die vorhandenen Enzymkomplexe zu schützen, sondern führt, wie die Abnahme der Wirksamkeit zeigt, zu einer Zerstörung dieser. Nimmt man an, daß Tryptophan bzw. Tryptophanpeptid und Hefegummi die Träger der zymoaktiven Substanz sind, ohne welche sie nicht beständig sein soll, so hat man auch für die Instabilität der restlichen Wirkung nach der Bestrahlung eine Erklärung gefunden. Während der Bestrahlung werden wegen ihrer starken Absorption des ultravioletten Lichtes zuerst die Tryptophanenzymkomplexe und in weit geringerem Maße die Hefegummikomplexe zerstört. Nach der Bestrahlung treten die dabei entstandenen Zerfallsprodukte mit den noch wirksamen Enzymkomplexen in Reaktion und bewirken eine Inaktivierung. Der Zusatz von Tryptophan und Hefegummi, mit denen die Zerfallsprodukte der Bestrahlung ebenfalls reagieren, hat, wie nach dem Massenwirkungsgesetz einzusehen ist, eine Verstärkung dieses Effektes zur Folge.

#### Z u s a m m e n f a s s u n g.

Die Versuche über das Verhalten der Enzymlösungen nach erfolgter Bestrahlung und über den Einfluß von Tryptophan und Hefegummi haben zu folgenden Ergebnissen geführt:

1. Zehn Minuten und länger bestrahlte Saccharaselösungen von bestimmtem Reinheitsgrad verlieren beim Stehen nach der Bestrahlung ihre restliche Wirksamkeit, während kürzer bestrahlte Enzymlösungen sich als stabil erweisen.

2. Durch Zusatz von Tryptophan und Hefegummi kann unter

den gewählten Versuchsbedingungen keine Reaktivierung erzielt werden. Es wird im Gegenteil die Nachinaktivierung beim Stehen beschleunigt, wobei Hefegummi stärker als Tryptophan wirkt. Sowohl neutrale als auch alkalische Tonerdeeluate führen zu demselben Ergebnis.

3. Schon der Zusatz von Tryptophan und Hefegummi allein genügt, um eine teilweise Inaktivierung bestrahlter Enzymlösungen herbeizuführen.

---



# Über Hefelipase

Von

GEORG GORBACH und HANS GÜNTNER

Aus dem Biochemischen Institut der Technischen Hochschule in Graz

Vorstand Prof. F. FUHRMANN

(Mit 5 Textfiguren)

(Vorgelegt in der Sitzung am 12. Mai 1932)

Die Lipasen und die Esterasen der Mikroorganismen sind vielfach Gegenstand von Untersuchungen gewesen. Dabei ergab sich allgemein, daß sie vielmehr zur Spaltung von Estern niederer Fettsäuren als zur Spaltung natürlicher Fette befähigt sind. Während zwar über die Esterasen und Lipasen der Bakterien auch modernere Untersuchungen nicht fehlen, sind diese Enzyme bei Hefen kaum untersucht. Unter den wenigen Veröffentlichungen darüber ist die Arbeit von MICHAELIS und NAKARAHARA<sup>1</sup> bemerkenswert, die über die  $p_H$ -Abhängigkeit der Wirkung von Esterasen aus Bierhefe Aufschluß gibt. Die Butyrinspaltung wurde unter Anwendung von Puffern und mit Hilfe der stalagnometrischen Methode bei  $p_H = 5.8 - 6.2$  optimal gefunden. Wir haben uns mit der Ermittlung der Spalteigenschaften der aus Bier- und Preßhefen gewonnenen Lipasen näher beschäftigt. Zur Messung der Lipasewirkung benutzen wir titrimetrische Methoden, welche unter Zuhilfenahme von Mikrobüretten und genauester Einhaltung der Versuchsbedingungen so weit verfeinert werden konnten, daß auch kleine Spaltungswerte noch auswertbar wurden.

## Versuchstechnik.

Die Messung der enzymatischen Fettspaltung führten wir, wie folgt, aus:

In einem Erlenmeyerkolben von 50 cm<sup>3</sup> Inhalt wird eine bestimmte Menge Hefe (1 g) eingewogen und mit 2 cm<sup>3</sup> ½ molarem Phosphatpuffergemisch von der gewünschten Wasserstoffionenkonzentration (meist entsprechend  $p_H = 6.8$ ) versetzt. Um eine gute Verteilung der Hefe im Puffergemisch zu erreichen, setzten wir

---

<sup>1</sup> L. MICHAELIS und Y. NAKAHARA, Z. Immunitätsforsch. I, Orig., 36, 1923, S. 449.

zuerst nur einen Teil des Puffers zu und verrieben damit die Hefe mit Hilfe eines Glasstempels zu einem gleichmäßigen Brei. Die am Glasstempel anhaftenden Hefereste werden mit einem Stückchen Filtrierpapier abgewischt und der Probe samt dem Filtrierpapier beigegeben. Dann kommt die auf  $2\text{ cm}^3$  noch fehlende Puffermenge hinzu. Durch einfaches Schütteln des Kölbchens mit der Hand erhält man eine gute Verteilung der Hefe im Puffer. Nach einstündigem Stehen ist die Lipase der Hefe durch die Einwirkung des  $\frac{1}{2}$  molaren Puffers freigelegt und für die Wirkungsbestimmung bereit. Die Kölbchen werden zu diesem Zwecke austariert und  $2.5\text{ g}$  feinstes Olivenöl (Extra vierge, Firma Meinel) durch tropfenweises Zufließenlassen aus einer Pipette rasch zugesetzt. Sofort nach der Zugabe des Öles schütteln wir das Gemisch drei Minuten auf der Schüttelmaschine und erzielen auf diese Weise eine innige Durchmischung der Hefe mit Öl und Puffer. Diese feine Emulsion läßt man nun reagieren. Nach Ablauf der Reaktionszeit, die normal 40 Minuten beträgt, wird die Reaktion durch Zugabe von  $20\text{ cm}^3$  Äthylalkohol unterbrochen und die Probe mit halbnormaler alkoholischer Kalilauge titriert. Zur Titration verwendeten wir Mikrobüretten, die halbe Zehntel Kubikzentimeter abzulesen und Hundertstel zu schätzen erlauben. Als Indikator diente Phenolphthalein. Während und besonders gegen Ende der Reaktion muß die Probe kräftig geschüttelt werden, da die anfängliche Rotfärbung dabei sofort verschwindet und erst bei bleibender Rosafärbung vergleichbare und richtige Titrationswerte erhalten werden. Um eine Konstanz der Titrationswerte innerhalb einer Versuchsreihe zu erreichen, wurde die Rosafärbung der folgenden Probe mit jener der vorausgehenden verglichen und auf gleiche Färbung aller Proben titriert. Der auf diese Weise erhaltene Titrationswert ist jedoch zu hoch, da durch die Einwirkung des starken Puffers die Hefe autolysiert wird und die dabei entstehenden Säuren mittitriert werden. Aus diesem Grunde wurde jedem Versuch eine Blindprobe beigegeben, welche das Puffergemisch und die Hefe, aber kein Öl enthielt. Diese Blindprobe wird zugleich mit der eigentlichen Probe titriert und der Verbrauch an alkoholischer Lauge von jenem der Probe in Abzug gebracht. Die so erhaltene Differenz stellt unter Berücksichtigung der freien Fettsäuren des Öles, welche von Zeit zu Zeit erneut bestimmt werden müssen, ein Maß für die Lipasewirkung vor.

Die *prozentuelle Fettspaltung* wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:



$$\text{Prozent-Fettspaltung} = \frac{(N - N_1) (56 \cdot 1.100 F)}{2 \cdot 5 (V_s - S_s)}$$

In derselben bedeuten  $N$  die zur Neutralisation der freien Fettsäuren nach der Spaltung notwendigen Kubikzentimeter Lauge,  $N_1$  die zur Neutralisation von 2.5 g Öl erforderlichen Kubikzentimeter KOH,  $F$  den Faktor der Lauge,  $S_s$  die Säurezahl und  $V_s$  die Verseifungszahl.

Die in den Tabellen angegebenen Werte beziehen sich einerseits auf die abgepreßte nasse Hefe und anderseits auf die Trockensubstanz derselben.

Die *Trockensubstanz* wurde bei normaler Hefe durch Trocknung bei 105° im Trockenschrank nach zwölf Stunden ermittelt. Die verfetteten Hefen trockneten wir im FAUST-HEIMSCHEN Gebläseschrank bei 40°, um eine Veränderung des Fettes hintanzuhalten und eine genaue Bestimmung des Fettgehaltes möglich zu machen. Bei Lipaseversuchen ist es nach Ablauf der Reaktionszeit üblich, durch Zusatz von Äther und Alkohol die Reaktion zu unterbrechen, wodurch man gleichzeitig eine Lösung der Fettsäuren herbeiführt, die erst dann titrierbar sind. Durch eingehende Versuche konnten wir zeigen, daß der Zusatz von Alkohol allein genügt, um richtige Werte zu erhalten. Die Beigabe des Äthers bringt keine Erhöhung, sondern sogar eine Verminderung der Werte.

### Versuche.

Die folgenden Versuche führten wir mit verschiedenen Hefen aus. Wir verwendeten hauptsächlich Bier- und Preßhefen. Letztere wurden in der handelsüblichen Packung eingekauft, während uns die Bierhefe von der Brauerei Reininghaus zur Verfügung gestellt wurde. Der erhaltene Wert für die Ölspaltung ist in den Tabellen für die feuchte Hefe und außerdem auf die Trockenhefe berechnet angegeben. Infolge des wechselnden Wassergehaltes der Hefen können nur die auf den Trockengehalt der Hefen berechneten Lipasewerte untereinander verglichen werden.

### I. Kinetik der Hefelipasespaltung.

#### 1. $p_H$ -Abhängigkeit.

In erster Linie interessierte uns der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit der lipati-

schen Verseifung. Wir verwendeten zu diesen Versuchen Ottakringer Preßhefe und studierten die Ölsplattung mit Phosphatgemischen von wechselnder Wasserstoffionenkonzentration.

Tabelle 1.

Nr. d. Vers.-R.	Olivenöl in g	Reaktionszeit in Stunden	Reaktionstemperatur in Graden	$\frac{1}{2}$ mol. Puffergemisch		$p_H =$	% Spaltung	
				$KH_2PO_4$	$K_2HPO_4$		Ottakringer Preßhefe 1 g	Trockenhefe (ber.) 1 g
I	2.5	3	20	19	1	5.4	0.87	3.0
				16	4	6.1	3.04	10.5
				13	7	6.6	4.92	17.5
				7	14	7.0	4.68	16.2
				1	20	7.8	4.16	14.3
II	2.5	18	20	19	1	5.4	1.64	5.6
				16	4	6.1	2.58	9.0
				13	7	6.6	3.34	11.5
				7	14	7.0	2.34	8.8
				1	20	7.8	2.99	10.3

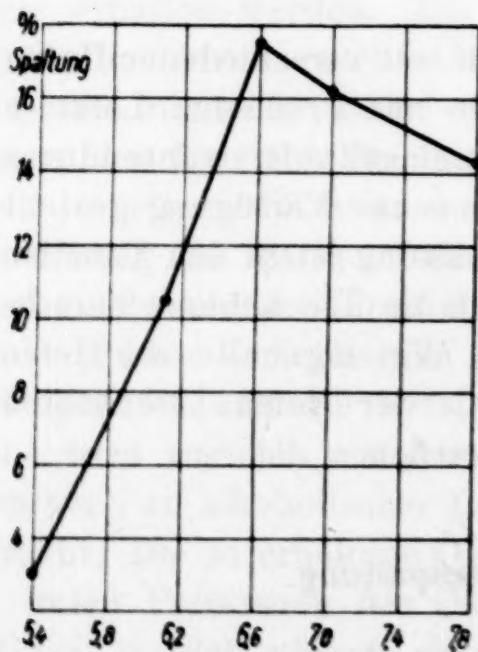


Fig. 1.

stellung trägt die Abszisse die  $p_H$ -Marken.

Die Tabelle 1 enthält die Versuchsergebnisse, welche bei Verwendung von zwei verschiedenen Hefeproben erhalten worden sind. Die optimale Verseifung liegt bei  $p_H = 6.6$ , wenn sich auch ab und zu in Einzelversuchen das Optimum bei  $p_H = 6.8$  einstellt. Die Zusammenstellung zeigt ferner, daß im allgemeinen bei der Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration die Verseifungsgeschwindigkeit stärker herabgesetzt wird als bei der Verminderung derselben. Die Schaulinie der Fig. 1 läßt diese Verhältnisse sehr deutlich erkennen. In dieser graphischen Dar-



## 2. Zeitlicher Verlauf der lipatischen Verseifung.

Durch zahlreiche Versuche wurde die Reaktionszeit ermittelt, nach welcher die lipatische Verseifung ihr Ende erreicht hat. Bei den anfänglichen Proben wählten wir Reaktionszeiten von mehreren Stunden. Es hat sich jedoch ergeben, daß die Spaltung des Öles schon nach relativ kurzer Zeit beendet ist. So erhielten wir mit Ottakringer Preßhefe, welche sich nach unseren Erfahrungen als lipasereich erwies, unabhängig davon, ob die Reaktionszeiten 50 Minuten oder eine Stunde und 50 Minuten betrugen, eine 9.5%ige Spaltung.

Tabelle 2.

Nr. d. Vers.-R.	Olivenöl in g	$p_H =$	Reaktionstemperatur in Graden	Reaktionszeit in Minuten	% Spaltung	
					Ottakringer Preßhefe 1 g (Trst. 29%)	
					feucht	trocken (berechnet)
I	2.5	6.8	20	3	2.22	7.7
				8	2.40	8.3
				20	2.87	9.9
				40	3.87	13.3
II	2.5	6.8	20	3	0.23	0.8
				8	0.52	1.9
				20	2.40	8.3
				40	2.93	10.1

Über den Verlauf der Ölsplaltung innerhalb des kurzen Zeitintervalls orientieren die Ergebnisse in Tabelle 2, welche mit zwei Hefeproben erhalten worden sind. Die in Fig. 2 gegebene graphische Darstellung dieser Resultate läßt erkennen, daß die Verseifung in den ersten Zeiten linear verläuft, später aber gehemmt erscheint.

## 3. Hefemenge und Reaktionsgeschwindigkeit.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 3 zusammengefaßt, deren Werte die Grundlage für die graphische Darstellung der Fig. 3 bilden.

Tabelle 3.

Olivenöl in g	$p_H =$	Reaktionstemperatur in Graden	Reaktionszeit in Stunden	Hefemenge in g	% Spaltung	
					Ottakringer Preßhefe 1 g (Trst. 29 %)	
					abgepreßt	trocken (berechnet)
2.5	6.8	20	6	0.5	0.70	2.4
				1.0	4.22	14.5
				2.0	6.97	24.0

Daraus ist ersichtlich, daß der doppelten Hefemenge *nicht* die doppelte Verseifungsgeschwindigkeit entspricht. 0.5 bis 1 g Hefe ergeben größere, 1 bis 2 g kleinere Geschwindigkeitswerte,

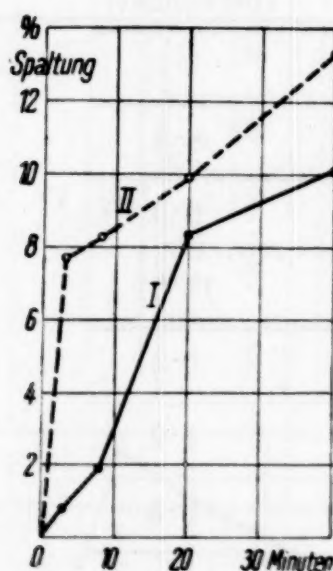


Fig. 2.

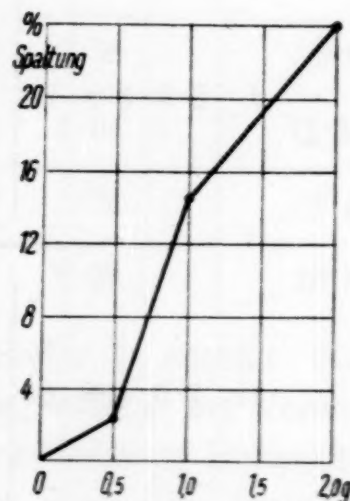


Fig. 3.

als sie entsprechend der angewandten Hefemenge erwartet werden könnten. Deshalb führten wir alle weiteren Versuche mit einem Gramm Hefe durch.

#### Reaktionstemperatur und Reaktionsgeschwindigkeit.

Für diese Versuche dienten Ottakringer Preßhefe und Reininghaus-Bierhefe. Die Temperatur wurde während der Reaktionszeit durch Einhängen der Proben in ein Wasserbad konstant gehalten.

Die Ergebnisse mit beiden Hefearten sind in der Tabelle 4 niedergelegt, während sich die graphische Darstellung der Fig. 4 auf die Bierhefe bezieht.



Tabelle 4.

Hefemenge in g	Olivenöl in g	$p_H =$	Reaktionszeit in Minuten	Reaktions- temperatur in Graden	% Spaltung			
					Ottakringer Preßhefe (Trst. 29 %)		Reininghaus-Bierhefe (Trst. 33 %)	
					abgepreßt	trocken (berechn.)	abgepreßt	trocken (berechn.)
1	2.5	6.8	40	10	1.90	6.6	1.68	5.0
				20	2.07	7.2	1.82	5.5
				25	—	—	1.85	5.9
				30	2.73	9.4	2.34	7.1
				35	—	—	1.93	5.9
				40	1.49	5.2	1.68	5.1
				50	1.46	5.1	1.10	3.3
				60	0.76	2.7	0.88	2.7

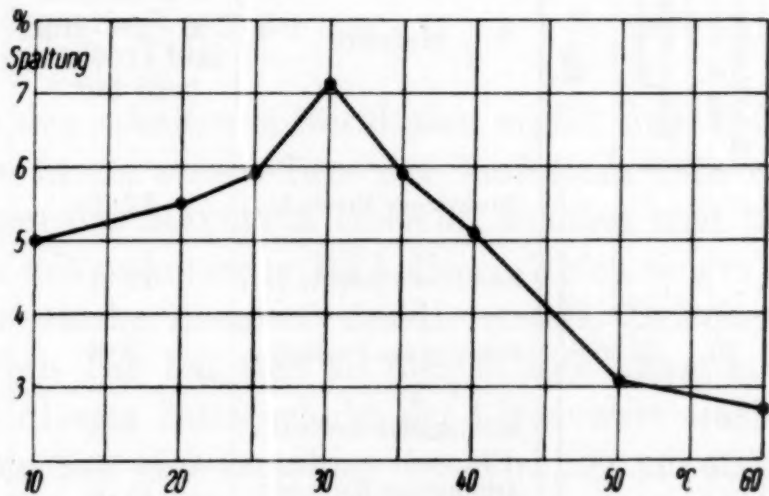


Fig. 4.

Sowohl die Untersuchungen mit Preßhefe als auch die mit Bierhefe zeigen, daß die Hefelipase ein ausgeprägtes Temperatur-optimum bei 30° besitzt. Die Fig. 4 veranschaulicht den bei verschiedenen Temperaturen erhaltenen Verseifungsgrad für Reininghaus-Bierhefe nach 40 Minuten Reaktionszeit. Die Fettspaltung steigt mit Erhöhung der Temperatur langsam an, erreicht bei 30° das Optimum und fällt bei höheren Temperaturen rasch ab. Bei 50° und 60° sind nur mehr kleine Spaltungswerte zu erhalten. Diese Temperaturen schädigen die Hefelipase offenbar stark in ihrer Wirkung.

## II. Der Lipasegehalt verschiedener Hefen.

Die Versuche über die Kinetik der Hefelipase haben gezeigt, daß die unter gleichen Bedingungen erhaltenen Ölspaltungswerte bei Bier- und Preßhefen differieren. Wir konnten ferner feststellen, daß selbst der Lipasegehalt einer und derselben Hefe in verschiedenen Hefeproben ziemlich Schwankungen unterliegt. Die Züchtungsbedingungen und der Reinheitsgrad der Hefe scheinen für ihren Lipasegehalt von Bedeutung zu sein. Durch eine große Anzahl von Messungen ermittelten wir den durchschnittlichen Lipasegehalt von Bier- und Preßhefen. Als Maß diente die von einem Gramm der Hefe in 40 Minuten bei 20° und  $p_H = 6.8$  bewirkte Spaltung des Olivenöles. Aus den erhaltenen Werten errechneten wir in ähnlicher Weise wie WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ die Phytolipase-Einheiten für 1 g Trockenhefe. Die so erhaltenen Durchschnittswerte sind in der Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5.

Nr. d. Vers.-R.	Hefemenge in g	Olivenöl in g	Reaktionstemperatur in Graden	Reaktionszeit in Minuten	$p_H =$	Hefeart	Durchschn. % Spaltung (auf Trockenhefe ber.)	Phytolipase-Einheiten
1	1	2.5	20	40	6.8	Ottakringer Preßhefe ..	12.7	1.7
2						Mauthner-Preßhefe ....	10.2	1.5
3						Reininghaus-Preßhefe ..	9.9	1.3
4						Reininghaus-Bierhefe ..	8.8	1.2
5						Reininghaus-Reinzuchthehe.....	11.8	1.6

Aus ihnen geht hervor, daß die Preßhefen einen höheren Lipasegehalt als die Bierhefen aufweisen. Die größte Menge zeigt die Ottakringer Preßhefe. Die Reinzuchthehe der Brauerei Reininghaus ist weitaus lipasereicher als die Betriebshefe dieser Brauerei.

## III. Lipasegehalt künstlich verfetteter Hefen.

Anschließend haben wir Untersuchungen über den Lipasegehalt *künstlich* verfetteter Bierhefen angestellt und die verseifende

<sup>2</sup> R. WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ, Z. physiol. Chem. 134, 1924, S. 161.



Wirkung solcher Hefen mit fortschreitender Verfettung verfolgt. Nach noch nicht veröffentlichten Methoden verfettete Hefen haben HALDEN und KUNZE in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt. Nach ihrer Methode wurde die Verfettung durch Züchten der Hefe in alkoholischer Atmosphäre erreicht. Nach bestimmten Tagen der Fettanreicherung wurde der Lipasewert solcher Hefen nach unserer Methode gemessen. Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle 6 für Reinzucht-Bierhefe mitgeteilt.

Tabelle 6.

Hefeart	Nr. d. Vers.-R.	Trockengehalt der Hefe in %	Hefemenge in g	Olivöl in g	$p_H =$	Reaktionstemperatur in Graden	Reaktionszeit in Minuten	Tage d. Verfett.	% Spaltung	
									feucht	trocken (berechnet)
Reininghaus-Reinzuchthefer	1	18.5	1	2.5	6.8	24	40	0	2.18	11.8
	2	19.5	1	2.5	6.8	24	40	4	1.29	6.7
	3	12.9	1	2.5	6.8	24	40	6	2.13	16.5
	4	28.3	1	2.5	6.8	24	40	8	2.16	7.6

Aus den erhaltenen Resultaten ergibt sich, daß die Wirkung der Lipase in die ersten Tage der Verfettung fällt und dann nach sechs Tagen das Maximum erreicht, welches weit über der Norm liegt. Das mikroskopische Bild dieser Hefen zeigte in den ersten Tagen eine starke Zunahme des Hefefettes. Zwischen dem vierten und sechsten Tag hat sich an diesem Bild kaum etwas geändert, obwohl in diesem Zeitabschnitt der Lipasewert stark ansteigt und am sechsten Tag eine Zunahme der Wirkung um 42% festzustellen ist, wenn man den Wert für die normale Hefe als Berechnungsgrundlage nimmt.

Die Tabelle 7 enthält die Resultate, welche wir bei Wiederholung ihrer Versuche mit *Betriebshefe* erhielten. Bei diesem Versuche wurde außerdem noch der Fettgehalt bestimmt. Die Fettwerte in der Tabelle beziehen sich auf das Fett in der Hefetrockensubstanz. Aus der Tabelle 7 geht hervor, daß der *Lipasegehalt* der Betriebshefe bis zum vierten Tage der Verfettung erhalten bleibt, während der *Fettgehalt* in dieser Zeit um 8% zugenommen hat. Nach dem vierten Tage steigt der Lipasegehalt und hat am siebenten Tag den Wert der normalen Hefe weit überschritten. Die Fettmenge ist dabei nur um 0.4% gestiegen. Nach dem siebenten Tag

fällt die Lipasewirkung stark, während der Fettgehalt kräftig ansteigt. Nach dem neunten Tag verändert sich der Lipasegehalt kaum mehr. Auch der Fettgehalt ist zwischen dem neunten und elften Tag der Verfettung gleichgeblieben.

Tabelle 7.

Hefeart	Nr. d. Vers.-R.	Trockengehalt der Hefe in %	Hefemenge in g	Olivenöl in g	$p_H =$	Reaktionstemperatur in Graden	Reaktionszeit in Minuten	Tage d. Verfett.	Fettgehalt in % des Trockengew.	% Spaltung	
										feucht	trocken (berechnet)
Reininghaus-Betriebshefe	1	27.3	1	2.5	6.8	20	40	0	2.0	1.64	6.0
	2	23.7	1	2.5	6.8	20	40	4	9.8	1.49	6.3
	3	26.5	1	2.5	6.8	20	40	7	10.2	2.81	10.6
	4	32.0	1	2.5	6.8	20	40	9	16.0	1.17	3.7
	5	36.7	1	2.5	6.8	20	40	11	15.8	1.26	3.4

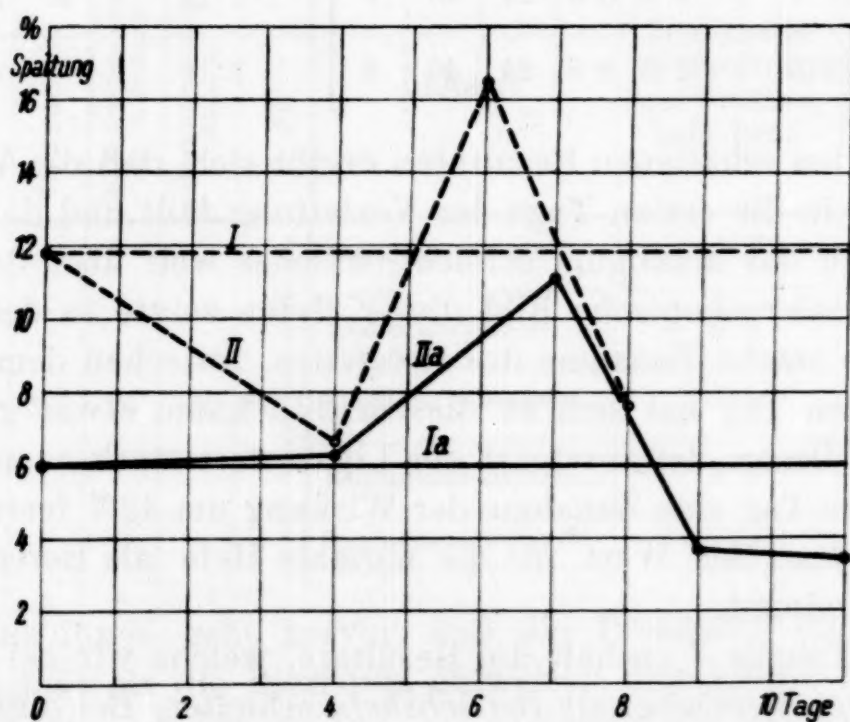


Fig. 5.

Die Ergebnisse der Tabelle 7 dienten den Schaulinien der Fig. 5 zur Unterlage. I und Ia entsprechen der normalen bzw. künstlich verfetteten Reinzuchtheife und II und IIa der normalen bzw. verfetteten Betriebsheife.

Fig. 5 zeigt, daß die Resultate, welche wir mit Betriebsheife und Reinzuchtheife erhalten haben, gut übereinstimmen. Die Maxima



der Lipasewirkung bekommt man nach sechs bis sieben Tagen der Verfettung. Die Art des Nährbodens bei der Verfettung spielt nach unseren Erfahrungen anscheinend keine Rolle. Man erhält auf Würze-Agar, synthetischen Agarnährböden (mit 10% Lävulose, 1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0, 2%  $\text{MgSO}_4$ ) und auf nährstofflosen Unterlagen dieselben Erfolge.

#### IV. Freilegung der Hefelipase und ihre Empfindlichkeit gegen Gifte.

Bei den Versuchen dieser Arbeit haben wir die Hefelipase mit *Phosphatgemischen* freigelegt. Durch einfaches Aufschlämmen der Hefe in diesen erhält man nach einstündiger Einwirkung des Puffergemisches gute Lipasewerte. Im folgenden sind die Versuche mitgeteilt, welche wir zur Ermittlung der optimalen Einwirkungszeit des Puffers angestellt haben.

Tabelle 8.

Olivenöl in g	$p_H =$	Reaktionstemperatur in Graden	Reaktionszeit in Minuten	Einwirkungszeit d. $\frac{1}{2}$ mol. Puffergem. in Stunden	% Spaltung	
					Ottakringer Preßhefe 1 g (Trst. 29 %)	
					feucht	trocken (berechnet)
2·5	6·8	19	40	1	3·75	12·9
				2	3·45	11·9
				4	3·28	11·3
				6	3·28	11·3
				24	2·57	8·9

Aus den Werten der Tabelle 8 geht hervor, daß eine einstündige Einwirkung des Puffers zur Freilegung der Hefelipase genügt, da ein längeres Verweilen der Hefe in dem Puffergemisch die lipatische Verseifung herabsetzt.

Eine weitere Möglichkeit zur Freilegung des Enzyms aus der Hefe besteht in der *Autolyse der Hefezelle*. Diese Methode, welche von WILLSTÄTTER<sup>3</sup> und seiner Schule weitgehend ausgebaut wurde, hat sich zur Gewinnung wirksamer Enzympräparate vielfach bewährt und wurde von uns für die Lipasegewinnung herangezogen. Durch die Abtötung der Hefe mit starken Zellgiften

<sup>3</sup> R. WILLSTÄTTER, Untersuchungen über Enzyme 2, 1928, Springer, Berlin.

und die darauf einsetzende Autolyse wird auch die Lipase wie andere Fermente aus ihrer Verankerung in der Zelle gelöst und durch die Zellwand an das umgebende Wasser abgegeben. Für die Darstellung wirksamer Lipasepräparate ist nun die Kenntnis jenes Zellgiftes wichtig, welches ohne wesentliche Schädigung der Wirkung eine weitgehende Freilegung der Lipase gestattet. Wir verwendeten als Zellgifte *Chloroform*, *Äther*, *Toluol* und *Azetessigester*. Durch Zugabe von  $0.3 \text{ cm}^3$  dieser Gifte zu  $1 \text{ g}$  abgepreßter Hefe töteten wir die Zellen und überließen sie während einer Stunde der Autolyse, welche durch zeitweiliges Rühren beschleunigt wurde. Nach dieser Zeit war der anfänglich feste Brei dünnflüssig geworden. Die autolysierte Hefe wurde entweder gleich zur Bestimmung der Lipase verwendet oder vorerst im FAUST-HEIMSCHEM Trockenapparat vom Zellgift befreit.

Die Fettspaltungswerte, welche wir ohne und mit Entfernung des Zellgiftes erhielten, sind in der Tabelle 9 wiedergegeben.

Tabelle 9.

Hefeart und Menge	Einwirkung des Zellgiftes i. St.	Olivöl in g	Reaktionstemperatur in Graden	Reaktionszeit in Minuten	$p_{\text{H}}$	Freilegung der Lipase durch	Spaltung in % (auf Trst. berechnet)	
							ohne Entfettung des Zellgiftes	mit Entfettung des Zellgiftes
Ottakringer Preßhefe 1 g (Trockengehalt 29%)	1	2.5	20	40	6.8	$\frac{1}{2}$ mol. Phosphat-Puffergemisch	12.9	—
						Chloroform	12.1	13.7
						Äther	11.3	12.7
						Toluol	7.9	13.0
						Azetessigester	4.4	5.8

Vergleicht man die Werte dieser Tabelle, welche ohne Entfernung des Zellgiftes erhalten worden sind, so findet man, daß im Vergleich zur Lipasewirkung, welche man in der von uns geübten Weise mit Phosphatgemischen als Freilegungsmittel erhält, alle untersuchten Gifte eine Minderung der Lipasewirkung herbeiführen. Diese Schädigung der Wirkung ist bei Chloroform am geringsten. Azetessigester führt die größte Schwächung der Hefelipase herbei. Entfernt man das Gift nach der Autolyse, werden sämtliche Lipasewerte höher. Es sind dann sowohl Chloroform wie Äther und Toluol zur Freilegung der Hefelipase gut brauchbar.



Der Lipasewert bei Chloroform als Zellgift übersteigt sogar jenen, welchen man mit Phosphatgemischen erhält. Aus diesen Untersuchungen geht daher hervor, daß Chloroform zur Autolyse zwecks Lipasegewinnung am geeignetsten ist.

Im Anschluß an diese Untersuchungen haben wir auch den Versuch unternommen, durch Autolyse der Hefe allein wirksame Lipaseextrakte zu gewinnen. Die besten Extrakte wurden unter Zusatz von konzentriertem Glyzerin zum unverdünnten Hefeautolysat erhalten. Die Wirkung solcher Extrakte, bezogen auf das Trockengewicht der Hefe, betrug ein Viertel bis ein Sechstel. Wählt man aber die Reaktionszeit länger, erhöht sich der erhaltene Spaltungswert beträchtlich. So erhielten wir aus Ottakringer Preßhefe einen Lipaseextrakt, der nach 40 Minuten Reaktionszeit eine Spaltung von 1·28% zeigte, nach 24 Stunden eine solche von 12·2%. Dabei entsprach 1  $\text{cm}^3$  des Extraktes 1 g der abgepreßten Hefe. Die Versuche über die Gewinnung wirksamer Lipaseextrakte sind keineswegs abgeschlossen, weshalb später darüber eingehend berichtet werden soll.

### Zusammenfassung.

1. Die Hefelipase besitzt ein ausgesprochenes Wirkungsoptimum bei  $p_H = 6\cdot6$  bis  $6\cdot8$ .
2. Die optimale Reaktionszeit beträgt 40 Minuten, sofern die Hefe unmittelbar zur Lipasebestimmung Verwendung findet.
3. Durch die Erhöhung der Hefemenge erhöht sich auch die Reaktionsgeschwindigkeit der lipatischen Verseifung; doch ist die pro Zeiteinheit erhaltene Spaltung des Öles der Hefemenge nicht proportional.
4. Die optimale Temperatur für die Hefelipase liegt bei  $30^\circ \text{C}$ . Höhere Reaktionstemperaturen schädigen die Hefelipase in ihrer Wirkung. Bei  $50$  und  $60^\circ$  sind nur mehr kleine Spaltungswerte zu erhalten.
5. Die Untersuchungen der verschiedenen Bier- und Preßhefen hat ergeben, daß die Preßhefen lipasereicher als die Bierhefen sind. Ebenso erweist sich die Reinzuchthefer bedeutend wirksamer als die Betriebshefe.
6. Durch künstliche Verfettung von Reinzucht-Bierhefen und Betriebshefen kann der Lipasegehalt gesteigert werden. Die Zunahme beträgt nach sechs bis sieben Tagen der Verfettung bis zu 42%, wenn der Lipasegehalt der Ausgangshefe als Berechnungsgrundlage dient.

7. Zellgifte, wie Chloroform, Äther, Toluol und Azetessigester, schädigen die Hefelipase. Die Wirkung des Fermentes wird durch Chloroform wenig und durch Azetessigester am stärksten beeinträchtigt. Bei Entfernung des Zellgiftes nach Abtötung der Hefe sind mit Ausnahme des Azetessigesters alle untersuchten Gifte zur Autolyse brauchbar. Am geeignetsten hat sich Chloroform erwiesen.

8. Durch Autolyse der Hefe allein können bei Zusatz von Glycerin wirksame Lipaseextrakte erhalten werden.

---



# Über Triphenylmethane, deren Benzolkerne miteinander verbunden sind

## VII. Methylen-diphenylen-phenyl-methanketon

Von

RICHARD WEISS und ERNEST KNAPP

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität in Wien

(Vorgelegt in der Sitzung am 12. Mai 1932)

Unter den kondensierten Derivaten des Triphenyl-methans, die der eine von uns mit seinen Mitarbeitern darstellte, finden sich nur solche, in welchen die Benzolkerne in Orthostellung zum zentralen Kohlenstoffatom durch Atomgruppen miteinander verbunden sind.

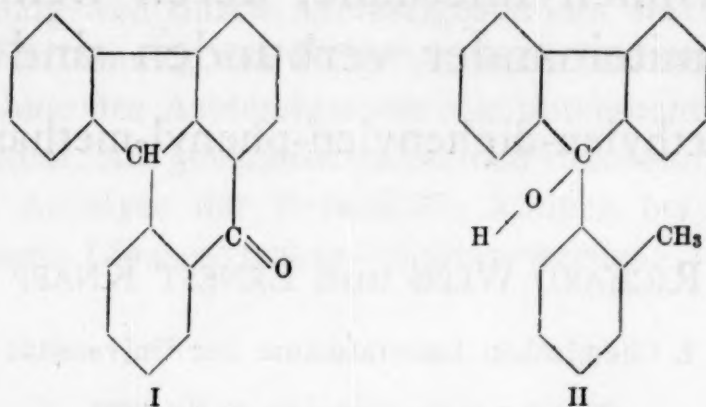
Ein Derivat dieser Körperklasse, in welchem der Ringschluß durch eine direkte Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung der Phenylgruppen bewirkt wird, ist bisher noch nicht dargestellt worden.

Da zu erwarten war, daß der Ersatz eines Sechs-Ringes durch einen Fünf-Ring die Valenzrichtungen des zentralen Methan-Kohlenstoffatoms merklich beeinflußt und somit manche Änderungen gegenüber den Produkten, die nur Sechs-Ringe enthalten, auftreten werden, schien es uns der Mühe wert, die Darstellung eines solchen Produktes zu versuchen.

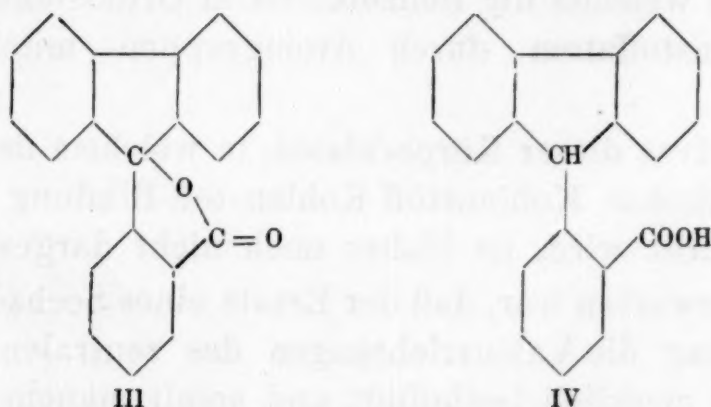
Zu den bisher gewonnenen kondensierten Ringsystemen gelangte man durch Wasserabspaltung aus Triphenylmethan-*o*-trikarbonsäuren bzw. Triphenylmethan-*o*-dikarbonsäuren. Da die direkte Verknüpfung zweier Phenylgruppen in einem Triphenylmethanderivat sicher mit Schwierigkeiten verbunden gewesen wäre, lag es nahe, von einem geeigneten Fluorenderivat auszugehen, dieses in ein Triphenylmethanderivat überzuführen und schließlich die Schließung der Sechs-Ringe in der bisher mit Erfolg von R. WEISS und seinen Mitarbeitern angewandten Weise vorzunehmen.

Zum einfachsten Vertreter dieser Anthrazen-Fluorenderivate, dem Methylen- -diphenylen-phenylmethanketon I, gelangten wir vom Fluorenon ausgehend, aus welchem wir durch Einwirkung von *o*-Tolylmagnesiumbromid in befriedigender Ausbeute das 9-*o*-Tolyl-9-oxyfluoren II vom F. P. 121—123° erhielten.

Die Charakterisierung der Verbindung erfolgte durch Darstellung eines Azetylderivates.



Kaliumpermanganat oxydierte die Methylgruppe dieses Karbinols zur Karboxylgruppe, und bei der Aufarbeitung des Reaktionsgemenges schied sich das *o*-Diphenylenphthalid III ab.



Natriumamalgam reduzierte das Lakton III zur 9-Phenylfluoren-2'-karbonsäure (*o*-Diphenylenphthalin) IV, die durch ihren Methyl-ester charakterisiert wurde.

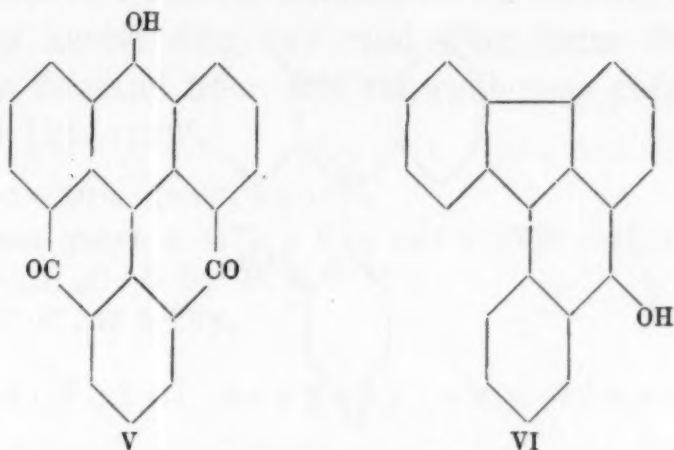
Die Wasserabspaltung aus dem Phthalin IV bereitete beträchtliche Schwierigkeiten und konnte erst durch Anwendung von Phosphorpentoxyd durchgeführt werden. Wir erhielten aus Xylol gelbbraune Kristalle, die sich bei 249° zersetzten. Die Analyse der Verbindung ergab Werte, die mit den für die Formel  $C_{20}H_{12}O$  berechneten übereinstimmten. Hiedurch ist es erwiesen, daß dem Produkt die Konstitution eines Methylen-diphenylen-phenylmethanketons I zukommt.

Die Bildung der kondensierten Systeme mit sechsgliedrigen Ringen aus Triphenylmethan-*o*-trikarbonsäuren erfolgt bei Anwendung fast aller wasserabspaltenden Reagenzien mit großer Leichtigkeit und ergibt gute Ausbeuten. Hingegen trat in dem hier beschriebenen Falle der Ringschluß nur bei Zuziehung von Phosphorpentoxyd als Kondensationsmittel ein und lieferte überdies nur geringe Ausbeuten. Dies ist wohl auf die Anwesenheit des



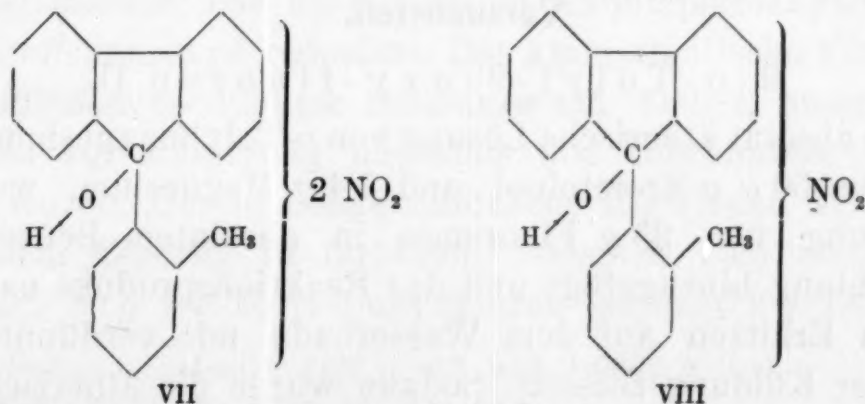
fünfgliedrigen Ringes zurückzuführen, der für die weitere Kondensation weniger günstige räumliche Bedingungen schafft als ein Sechsring.

R. WEISS und F. MÜLLER<sup>1</sup> haben durch die Darstellung eines Azylderivates festgestellt, daß sich das Trimethylentriphenylmethantriketon sehr leicht tautomer in ein Anthranolderivat V umwandelt.



Als wir aus dem Methylen-diphenylen-phenylmethanketon das analoge Azetylderivat darstellen wollten, erwies sich diese Verbindung dem Säurechlorid gegenüber als nicht reaktionsfähig. Dieses Verhalten erscheint dadurch verständlich, daß der ebene Bau des Anthranolderivates VI stärkere Spannungen aufweisen müßte als das räumlich konstituierte Keton I, während beim Trimethylentriphenylmethantriketon gerade das Gegenteil zutrifft.

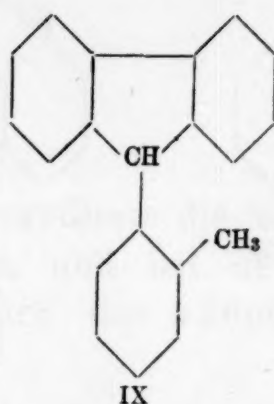
Die Umwandlung des 9-*o*-Tolyl-9-oxyfluorens in das *o*-Diphenylenphthalid gestaltete sich sehr zeitraubend und war mit großen Substanzverlusten verbunden. Wir trachteten daher, in das Karbinol eine Karboxylgruppe einzuführen, um durch die Alkalilöslichkeit der Verbindung günstigere Bedingungen für die Oxydation der Methylgruppe zu schaffen. Zu diesem Zweck behandelten wir das Karbinol mit rauchender Salpetersäure, wobei unter Anwendung verschiedener Reaktionsbedingungen ein Dinitro- VII



<sup>1</sup> Diese Versuche sind bisher noch nicht veröffentlicht worden.

oder Mononitroderivat VIII entstand. Ersteres schmolz bei 222° bis 223°, während sich das letztere bei 155—157° verflüssigte. Durch Reduktion mit Zinnchlorür ging das Mononitroprodukt in die entsprechende Aminoverbindung über. Unsere Bemühungen, in dieser Verbindung die Aminogruppe durch die Nitrilgruppe zu ersetzen, führten nicht zum Ziel.

Bei den ersten Einwirkungen des *o*-Tolylmagnesiumbromids



auf Fluorenon erhielten wir nicht das 9-*o*-Tolyl-9-oxyfluoren, sondern den entsprechenden Kohlenwasserstoff, das 9-*o*-Tolyl-fluoren IX. Das durch Destillation gereinigte Produkt lieferte, aus Alkohol umgelöst, farblose Nadeln, die bei 129—130·5° schmolzen. Die Analyse zeigte, daß die Verbindung mit  $\frac{1}{4}$  Mol Wasser kristallisiert. Es liegt also hier der seltene Fall vor, daß ein Kohlenwasserstoff Kristallwasser bindet. Um nachzuweisen, daß wirklich nur eine Additionsverbindung vorlag, kochten wir das analysenreine Produkt mit Natrium in absolutem Benzol. Nach dieser Behandlung schmolz es, aus Ligroin umkristallisiert, bei 133°. Die Analyse ergab Werte, die mit den für den Kohlenwasserstoff  $C_{20}H_{16}$  berechneten übereinstimmten.

Zur weiteren Charakterisierung stellten wir daraus ein Mononitroderivat  $C_{20}H_{15}O_2N$  dar, das aus Eisessig in schwachgelben Blättchen vom F. P. 156—157° kristallisierte.

### Versuchsteil.

#### 9 - o - T o l y l - 9 - o x y - f l u o r e n II.

Eine absolut ätherische Lösung von *o*-Tolylmagnesiumbromid, bereitet aus 50 g *o*-Bromtoluol und 7·4 g Magnesium, wurde zu einer Lösung von 35 g Fluorenon in absolutem Benzol unter Wasserkühlung hinzugefügt und das Reaktionsprodukt nach fünfständigem Erhitzen auf dem Wasserbade mit verdünnter Salzsäure unter Kühlung zersetzt. Sodann wurde die ätherisch-benzolische Lösung im Scheidetrichter abgetrennt, das Lösungsmittel



verdampft und das zurückbleibende Öl mit Wasserdampf destilliert, um das als Nebenprodukt entstandene Ditolyl sowie das nicht in Reaktion getretene Fluorenon zu entfernen. Der so erhaltene Destillationsrückstand wurde ausgeäthert, die ätherische Schichte mit geschmolzenem Chlorkalzium getrocknet und nach dem Vertreiben des Lösungsmittels der Rückstand aus 80%igem Alkohol umkristallisiert. Aus der wässerig-alkoholischen Lösung fiel der Körper beim Erkalten zuerst ölig aus und ging beim Anreiben in den kristallisierten Zustand über. Die schwach rosa gefärbten Kristalle schmolzen bei 121—123°.

Ausbeute 50% der Theorie.

0.1482 g Substanz gaben 0.4775 g CO<sub>2</sub> und 0.0759 g H<sub>2</sub>O.

Ber. für C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>O: C 88.19, H 5.92%.

Gef.: C 87.87, H 5.73%.

#### 9-o-Tolyl-9-azetyloxy-fluoren.

1.5 g 9-o-Tolyl-9-oxy-fluoren wurden mit 30 g Essigsäureanhydrid und 3 g geschmolzenem Natriumazetat am Rückflußkühler vier Stunden erhitzt und nach dem Erkalten in Wasser gegossen. Hierbei schied sich schließlich aus dem zersetzten Gemenge ein fester Körper ab, der aus Eisessig umgelöst wurde. Die farblosen Kristalle zeigten den Schmelzpunkt 174—177°.

Ausbeute 75% der Theorie.

0.1510 g Substanz gaben 0.4655 g CO<sub>2</sub> und 0.0747 g H<sub>2</sub>O.

Ber. für C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>: C 84.04, H 5.77%.

Gef.: C 84.08, H 5.54%.

#### o-Diphenylenphthalid oder Lakton der 9-Oxy-9-phenylfluoren-2'-karbonsäure III.

Eine Aufschlammung von 0.5 g 9-o-Tolyl-9-oxy-fluoren in einer wässerig-alkalischen Lösung von 0.5 g Kaliumpermanganat wurde sieben Stunden am Rückflußkühler auf freier Flamme erhitzt und nachher das überschüssige Kaliumpermanganat mittels Wasserstoffsuperoxyd reduziert. Das klare alkalische Filtrat ergab beim Zufießen verdünnter Salzsäure ein weißes, amorphes Produkt, das zur Reinigung nochmals mit verdünntem Alkali behandelt wurde. Der in Lauge unlösliche Rückstand kristallisierte aus heißem Eisessig in farblosen Stäbchen vom Schmelzpunkt 226—229°. 30 g 9-o-Tolyl-9-oxy-fluoren ergaben 2 g Lakton.

0.1435 g Substanz gaben 0.4427 g CO<sub>2</sub> und 0.0602 g H<sub>2</sub>O.

Ber. für C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>: C 84.48, H 4.25%.

Gef.: C 84.14, H 4.69%.

## 9-Phenylfluoren-2'-karbonsäure IV.

Eine kochende alkoholische Lösung von 1.2 g *o*-Diphenylenphthalid wurde mit 30 g 3%igem Natriumamalgam auf dem Wasserbade erhitzt. Nach dem Aufhören der Wasserstoffentwicklung wurde der Alkohol abdestilliert, der Rückstand mit heißem Wasser ausgelaugt und die wässrige Lösung vom Quecksilber abgegossen. Das klare, erkaltete Filtrat ergab auf Zusatz verdünnter Salzsäure ein weißes flockiges Produkt, das aus Eisessig in farblosen Blättchen vom Schmelzpunkt 243—246° kristallisierte.

Ausbeute 80% der Theorie.

0.1410 g Substanz gaben 0.43 18 g CO<sub>2</sub> und 0.0653 g H<sub>2</sub>O.

Ber. für C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>: C 83.88, H 4.93%.

Gef.: C 83.52, H 5.18%.

## 9-Phenylfluoren-2'-karbonsäuremethylester.

1 g Monokarbonsäure IV wurde in 50 cm<sup>3</sup> absolutem Äther gelöst und durch Einleiten von Diazomethan verestert. Nach zwölfstündigem Stehen der ätherischen Lösung und Verdampfen des Lösungsmittels ergab der mit verdünnter Sodalösung behandelte Körper, aus absolutem Methylalkohol umgelöst, farblose Blättchen, die den Schmelzpunkt 112—114° zeigten.

Ausbeute 80% der Theorie.

0.1408 g Substanz gaben 0.4342 g CO<sub>2</sub> und 0.0710 g H<sub>2</sub>O.

Ber. für C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>: C 83.96, H 5.37%.

Gef.: C 84.10, H 5.64%.

## Methylen-diphenylen-phenyl-methan keton I.

2 g 9-Phenylfluoren-2'-karbonsäure wurden in 100 cm<sup>3</sup> absolutem Benzol gelöst und nach Zusatz von 14 g Phosphorpentoxyd 3—4 Stunden auf dem siedenden Wasserbade unter Feuchtigkeitsausschluß erhitzt. Hierauf destillierten wir das Lösungsmittel ab und behandelten das Reaktionsprodukt mit verdünnter Natronlauge. Der Rückstand ergab nach dem Trocknen aus heißem Xylol gelbbraune langgezogene Prismen, die sich bei 249° zersetzen.

Ausbeute 16% der Theorie.

4.164 mg Substanz gaben 13.684 mg CO<sub>2</sub> und 1.730 mg H<sub>2</sub>O<sup>2</sup>.

Ber. für C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>O: C 89.52, H 4.51%.

Gef.: C 89.62, H 4.64%.

Dinitro-9-*o*-tolyl-9-oxy-fluoren VII.

Eine Aufschlammung von 1 g 9-*o*-Tolyl-9-oxy-fluoren in 10 cm<sup>3</sup> Eisessig wurde mit 6 cm<sup>3</sup> rauchender Salpetersäure tropfen-

<sup>2</sup> Diese Analyse wurde von Herrn Dr. A. FRIEDRICH, Wien, ausgeführt.



weise unter Wasserkühlung versetzt. Nach mehrstündigem Stehen schied sich auf Zusatz von Wasser ein Produkt ab, das aus Eisessig schwach gelb gefärbte Kristalle lieferte, die bei 222—223° schmolzen.

Ausbeute 50% der Theorie.

0.1428 g Substanz gaben 0.3477 g CO<sub>2</sub> und 0.0542 g H<sub>2</sub>O.

0.2110 g „ „ 15.52 cm<sup>3</sup> N bei 19° und 737 mm Hg.

Ber. für C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>: C 66.28, H 3.90, N 7.74%.

Gef.: C 66.41, H 4.24, N 7.80%.

#### Mononitro-9-o-tolyl-9-oxy-fluoren VIII.

5 g 9-o-Tolyl-9-oxy-fluoren wurden in 100 cm<sup>3</sup> kaltem Eisessig gelöst und wie oben unter Eiskühlung mit 25 cm<sup>3</sup> rauchender Salpetersäure nitriert. Nach der gleichen Behandlung wie beim vorhergehenden Versuch erhielten wir durch Umlösen des Reaktionsproduktes aus 80%igem Alkohol schwachgelbe rhombische Kristalle vom Schmelzpunkt 155—157°.

Ausbeute 70% der Theorie.

0.1412 g Substanz gaben 0.3902 g CO<sub>2</sub> und 0.0593 g H<sub>2</sub>O.

0.2168 g „ „ 8.2 cm<sup>3</sup> N bei 14° und 746 mm Hg.

Ber. für C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>N: C 75.68, H 4.77, N 4.42%.

Gef.: C 75.37, H 4.70, N 4.42%.

#### Amino-9-o-tolyl-fluoren.

Eine siedende Lösung von 8 g Mononitro-9-o-tolyl-9-oxy-fluoren in 50 cm<sup>3</sup> Eisessig wurde mit einer ebenfalls siedenden Lösung von 36.2 g Zinnchlorür in wenig konzentrierter Salzsäure vereinigt und bis fast zur Trockne eingedampft. Aus dem mit überschüssigem Ammoniak versetzten Rückstand schied sich auf Zufügung von gelbem Ammonsulfid das freie Amin ab. Das getrocknete Produkt lieferte aus absolutem Alkohol die freie Base in bräunlichen Kristallen vom Schmelzpunkt 131—134°.

Ausbeute 70% der Theorie.

0.1571 g Substanz gaben 0.5080 g CO<sub>2</sub> und 0.0890 g H<sub>2</sub>O.

Ber. für C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>N: C 88.52, H 6.32%.

Gef.: C 88.19, H 6.34%.

Wurde nach der Reduktion des Mononitro-9-o-tolyl-9-oxy-fluorens mit Zinnchlorür das Reaktionsprodukt durch verdünnte Natronlauge unter Eiskühlung alkalisch gemacht und mit Äther ausgeschüttelt, so erhielten wir nach dem Abdampfen des Lösungsmittels einen Körper, der nur als Chlorhydrat kristallisiert erhalten werden konnte. Als Kristallisationsmittel verwendeten wir absoluten, mit trockenem Chlorwasserstoff gesättigten Methyl-

alkohol. Beim Erhitzen im Schmelzpunktapparat auf  $200^{\circ}$  trat Zersetzung ein.

Die Ausbeute war bei dieser Behandlungsweise bedeutend geringer.

0.1479 g Substanz gaben 0.4257 g  $\text{CO}_2$  und 0.0775 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Ber. für  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NCl}$ : C 78.02, H 5.90%.

Gef.: C 78.50, H 5.86%.

#### 9-o-Tolylfluoren IX.

Zu einer absolut ätherischen Lösung von 44 g Fluorenon wurde eine absolut ätherische Lösung von o-Tolylmagnesiumbromid, bereitet aus 66.5 g o-Bromtoluol und 9.4 g Magnesium, gegossen. Nach mehrstündigem Erhitzen auf dem Wasserbade wurde das gelbe Reaktionsprodukt mit verdünnter Salzsäure unter Kühlung zersetzt, die Ätherschicht im Scheidetrichter abgetrennt, das Lösungsmittel abdestilliert und das zurückbleibende Öl der Wasserdampfdestillation unterworfen. Das so gewonnene Rohprodukt konnte erst nach einer Destillation im Vakuum, wobei es unter einem Druck von 12 mm Hg zwischen  $205\text{--}220^{\circ}$  überging, aus Alkohol in farblosen Nadeln vom Schmelzpunkt  $129\text{--}130.5^{\circ}$  erhalten werden.

Ausbeute 12% der Theorie.

0.1512 g Substanz gaben 0.5071 g  $\text{CO}_2$  und 0.0866 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Ber. für  $\text{C}_{20}\text{H}_{16} \frac{1}{4} \text{H}_2\text{O}$ : C 92.08, H 6.38%.

Gef.: C 92.28, H 6.41%.

Um das Kristallwasser zu entfernen, wurde das analysenreine Produkt mit Natrium in absolutem Benzol am Rückflußkühler unter Feuchtigkeitsausschluß erhitzt. Der aus absolutem Ligroin mehrmals umgelöste Körper schmolz nunmehr bei  $133^{\circ}$ .

0.1408 g Substanz gaben 0.4820 g  $\text{CO}_2$  und 0.0772 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Ber. für  $\text{C}_{20}\text{H}_{16}$ : C 93.71, H 6.29%.

Gef.: C 93.36, H 6.14%.

#### Nitro-9-o-Tolylfluoren.

1 g 9-o-Tolylfluoren wurde in 50  $\text{cm}^3$  Eisessig unter Kühlung mit 5  $\text{cm}^3$  rauchender Salpetersäure tropfenweise versetzt. Nach zwölfstündigem Stehen fällte ein Zusatz von Wasser ein schwachgelbes amorphes Produkt, das aus Eisessig schwachgelbe Kristalle vom Schmelzpunkt  $156\text{--}157^{\circ}$  lieferte.

Ausbeute 80% der Theorie.

0.1533 g Substanz gaben 0.4460 g  $\text{CO}_2$  und 0.0691 g  $\text{H}_2\text{O}$

0.1674 g „ „ 6.8  $\text{cm}^3$  N bei  $17^{\circ}$  und 754 mm Hg.

Ber. für  $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}$ : C 79.70, H 5.02, N 4.65%.

Gef.: C 79.35, H 5.04, N 4.74%.



# Zur Kenntnis der Fluoreszenz des Zinkoxydes (Beiträge zur Lumineszenzanalyse, IV<sup>1</sup>)

Von

ERNST BEUTEL und ARTUR KUTZELNIGG

Aus dem Technologischen Institut der Hochschule für Welthandel in Wien

(Mit 2 Textfiguren)

(Vorgelegt in der Sitzung am 27. Mai 1932)

I. In früheren Mitteilungen <sup>2</sup> war darauf hingewiesen worden, daß *Zinkoxydarten verschiedener Herstellungsweise verschiedene Fluoreszenzfarben* zeigen, wenn sie dem durch Schwarzglas filtrierten Lichte einer Quarzlampe ausgesetzt werden.

Im Hinblick auf die *große Zahl der darstellbaren Zinkoxydarten* <sup>3</sup> (die sich bei gleicher chemischer Zusammensetzung und Kristallform <sup>4</sup> doch in ihren Eigenschaften weitgehend unterscheiden können <sup>5</sup>) und die *vielfache technische Verwendung* des Zinkoxydes <sup>6</sup> schien es am Platze, die *Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Herstellungsart und der Vorbehandlung* näher zu studieren.

Als ein Ergebnis der Untersuchung sei vorausgeschickt, daß *bestimmte Zinkoxydsorten* durch ihre Fluoreszenzfarbe gut gekennzeichnet sind und daß es, obwohl Versuche in dieser Hinsicht noch nicht vorgenommen wurden, aussichtsreich erscheint, gewisse technisch erwünschte Eigenschaften mit der Fluoreszenz

<sup>1</sup> III: Monatsh. Chem. 57, 1931, S. 15, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 139, 1930, S. 697.

<sup>2</sup> Monatsh. Chem. 55, 1930, S. 158, und 57, 1931, S. 9, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (II b) 139, 1930, S. 74, und 139, 1930, S. 691.

<sup>3</sup> Vgl. z. B. A. FISCHHÄNDLER, Untersuchungen am Zinkoxyd, Diss. Bern, 1911, Gmelin, VIII, Syst. Nr. 32, S. 128. Ferner die Arbeiten von HÜTTIG und Mitarbeitern, Z. anorg. Chem. 198, 1931, S. 206. Siehe auch die verschiedenen Zinkweiß-Siegelmarken.

<sup>4</sup> Nach HEDVALL (Z. anorg. Chem. 120, 1922, S. 327) zeigen ZnO-Proben der nachfolgenden Herstellungsweisen die gleichen Röntgeninterferenzen: Zinkit, Zn-Staub in O<sub>2</sub> auf 600° erhitzt, ZnO<sub>2</sub> auf 600° erhitzt, gefälltes Zinkkarbonat auf 1100° erhitzt, Zinkazetat und -laktat auf 600° erhitzt. Andere Autoren zeigten, daß auch dem durch Fällung erhaltenen ZnO das gleiche Gitter zukommt.

<sup>5</sup> Farbe: weiß bis deutlich gelb, Dichte (nach EIBNER) 5·13—5·63 usw.

<sup>6</sup> Als Anstrichfarbe, Katalysator bei der Methanolsynthese, Füllstoff in der Kautschukindustrie, in der Pharmazie usw.

in Beziehung zu setzen, um so geeignete Sorten rasch erkennen zu können.

II. An die Stelle der nur qualitativen Betrachtungsweise früherer Untersuchungen setzten wir die *zahlenmäßige Kennzeichnung der Fluoreszenzfarbe mit Hilfe des Zeißschen Stufenphotometers*. Dadurch war es möglich, den Einfluß bestimmter Faktoren, z. B. der thermischen Vorbehandlung, auf die Fluoreszenz bis zu einem gewissen Grade quantitativ zu erfassen. Die Brauchbarkeit des Stuphos für den vorliegenden Zweck war in einer vorangehenden Mitteilung<sup>1</sup> festgestellt worden.

Die *Einrichtungen des Stufenphotometers* sowie seine *Anwendung zur Messung der Fluoreszenz* wurden von F. LÖWE eingehend beschrieben und es kann daher auf diese Darstellung verwiesen werden<sup>7</sup>.

Als Filter verwendeten wir solche der K-Reihe (sonst für die Farbmessung nach OSTWALD bestimmt). Als günstig erwiesen sich: das rote Filter  $K_I$  (Filterschwerpunkt  $636\text{ m}\mu$ ), das grüne Filter  $K_V$  (Schwerpunkt  $500\text{ m}\mu$ ) und das blaue Filter  $K_{VI}$  (Schwerpunkt  $450\text{ m}\mu$ ).

Bei Vorschaltung des *grünen* Filters ergaben sich meist nur niedrigere Ablesungen, was verständlich ist, da als Vergleichsnormale das stark gelbgrün fluoreszierende Uranglas diente; trotzdem waren diese Werte recht kennzeichnend. Die Beobachtung durch das *rote* Filter ist für das Auge sehr ermüdend und liefert daher die ungenauesten Werte. Bei der Untersuchung der *kreß* fluoreszierenden Proben war die Reproduzierbarkeit jedoch gut.

Es sei an dieser Stelle betont, daß unsere Messungen nicht Anspruch erheben, absolut gültige Werte zu liefern, sondern daß es sich in erster Linie darum handelte, die *Proben einer Versuchsreihe untereinander zu vergleichen*, wobei die Ablesung stets unter denselben Bedingungen erfolgte. Die von HAITINGER<sup>8</sup> geäußerten Bedenken, daß die Fluoreszenzstärke der Uranglasscheibe veränderlich sei, konnte aus diesem Grunde außer acht gelassen werden.

Um die Proben immer in gleicher Lage gegenüber dem Quarzbrenner aufstellen zu können, bedienten wir uns bei der Einstellung des Hilfsmittels, den oberen Rand des Probengestelles genau in die Schattenlinie der Filtereinfassung zu bringen. Die Übereinstimmung der Messungsergebnisse war stets, selbst nach einem Zeitraum von  $1\frac{1}{2}$  Jahren, befriedigend.

<sup>7</sup> F. LÖWE in Berl-Lunge, Chem.-techn.-Unters.-Meth. VIII. Aufl. I. Band, S. 907 und S. 921.

<sup>8</sup> M. HAITINGER, Mikrochemie 9, 1931, S. 441.



III. Die Frage, ob die *Fluoreszenz des Zinkoxydes* diesem *selbst eigentümlich* oder auf die *aktivierende Wirkung von Fremdmetailspuren* zurückzuführen sei, war nicht der eigentliche Untersuchungsgegenstand, doch können die gewonnenen Ergebnisse zu ihrer Klärung dienen.

G. C. SCHMIDT<sup>9</sup> hatte die durch *Kanalstrahlen* erregte grüne Fluoreszenz der Wirkung von Kadmiumspuren zugeschrieben, da er durch besondere Reinigung ein Zinkoxyd herstellen konnte, das keine Lumineszenz mehr zeigte, jedoch durch Glühen unter Zusatz von etwas *Kadmiumsulfat* lumineszenzfähig wurde. Dementsprechend ist das Zinkoxyd auch im Handbuch der Experimentalphysik von WIEN-HARMS, Band XXIII/1, S. 424, 1928, den Lenardphosphoren zugeordnet.

Dieser Auffassung SCHMIDT<sup>8</sup> trat TAFEL entgegen<sup>10</sup> und auch KOHLSCHÜTTER<sup>11</sup>, der eine Abhängigkeit der Kathodolumineszenz von der Darstellungsart des Zinkoxydes beobachtete, stellte fest, daß ziemlich verwickelte Erscheinungen vorliegen, die *nicht allein* mit der Annahme von Spuren fremder Beimengungen erklärt werden können.

Auch unsere Versuche, die allerdings die Ultraviolettfluoreszenz betrafen, zeigten die *Abhängigkeit von der Darstellungsweise* und erbrachten verschiedene Einwände gegen die Annahme der Fremdmetallaktivierung. Ein in durchsichtigen Nadeln *kristallisiertes* Zinkoxyd, das durch Sublimation im Elektroofen gewonnen worden war, fluoreszierte ebenso wie die durch *Fällung oder Alterung* bei Zimmertemperatur gewonnenen Zinkoxydniederschläge<sup>12</sup> und auch Präparate, die *aus Zinkmethyl* durch Verbrennen oder durch Umsetzung mit Wasser und Alterung dargestellt wurden, fluoreszierten. (Da Kadmiummethyl bei 105·5°<sup>13</sup>, Zinkmethyl schon bei 46° siedet, ist hier die Gegenwart von Kadmiumspuren besonders unwahrscheinlich.)

Eine Bestätigung unserer, auch schon früher ausgesprochenen Ansicht<sup>14</sup> brachte eine Arbeit von E. KÖRNER<sup>15</sup>, zu deren Kenntnis wir zufällig gelangten. E. KÖRNER stellte reinstes Zinkoxyd aus Chlorzink her, das er u. a. fünfmal im Vakuum destillierte, ohne aber das Ergebnis G. C. SCHMIDT<sup>8</sup> reproduzieren zu können, da alle seine Präparate nach dem Glühen fluoreszierten.

<sup>9</sup> G. C. SCHMIDT, Ann. Physik (4) 13, 1904, S. 622.

<sup>10</sup> J. TAFEL, Ann. Physik (4) 11, 1903, S. 613, 14, 1904, S. 206.

<sup>11</sup> V. KOHLSCHÜTTER, Z. Elektrochem. 17, 1911, S. 397.

<sup>12</sup> A. KUTZELNIGG, Z. anorg. Chem. 201, 1931, S. 323.

<sup>13</sup> E. KRAUSE, Ber. D. ch. G. 50, 1918, S. 1813.

<sup>14</sup> E. BEUTEL und A. KUTZELNIGG, Monatsh. Chem. 55, 1930, S. 163, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (IIb) 139, 1930, S. 79.

<sup>15</sup> E. KÖRNER, Über die Darstellungsmethoden und die Lumineszenzfähigkeit reinsten Zinksulfids und Zinkoxydes, Dissertation, Greifswald 1930.

Er folgert daher, daß das kristallisierte Zinkoxyd zu der Klasse der *ohne Fremdmetall lumineszenzfähigen anorganischen Substanzen* gerechnet werden müsse.

#### IV. Die Untersuchung erstreckte sich:

1. Auf den *Zusammenhang* zwischen der *Bildungsweise* und der *Fluoreszenz*.
2. Auf die *Beziehungen* zwischen *physikalischen Eigenschaften* und der *Fluoreszenz*. (Eigenfarbe, Korngröße, Dichte.)
3. Auf den *Einfluß* einer *thermischen Vorbehandlung*.
4. Auf den *Einfluß mechanischer Bearbeitung* und
5. auf die *Änderung* der Fluoreszenz durch den Einfluß von *Kohlendioxyd* und *Wasserdampf*.

Die Punkte 4 und 5 sind zunächst zu behandeln, da sowohl die Kenntnis des Einflusses des Luftkohlendioxydes als auch der Wirkung von Druckbeanspruchungen für die Ermittlung reproduzierbarer Werte Voraussetzung ist.

*Ausgangsstoff* für die im folgenden zu besprechenden Versuche war, sofern nicht anders vermerkt, *Zinkoxyd Merck, pro analysi*. Die Fluoreszenz dieses Präparates ist als *hellgelbbraun* zu bezeichnen. Die Kennzahlen sind:

K <sub>I</sub>	K <sub>V</sub>	K <sub>VI</sub>
33	3·3	72

#### 1. Der Einfluß der Kohlendioxydaufnahme auf die Fluoreszenz.

Daß Zinkoxyd an der Luft Kohlendioxyd aufnimmt, ist längst bekannt<sup>16</sup>. Das Ergebnis der Einwirkung ist die Bildung von basischem Karbonat der Zusammensetzung  $5 \text{ ZnO} \cdot 2 \text{ CO}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ <sup>17</sup>. Da diese Verbindung<sup>18</sup> verhältnismäßig *hellveil* fluoresziert, war eine Änderung der Fluoreszenz des Zinkoxydes beim Lagern an der Luft zu erwarten und die schlechte Reproduzierbarkeit einiger Vorversuche konnte auf diesen Umstand zurückzuführen sein. Es wurden daher Versuche angestellt, die folgendes Ergebnis zeigten:

<sup>16</sup> Vgl. FISCHHÄNDLER, a. a. O.

<sup>17</sup> Nach KRAUT, Z. anorg. Chem. 13, 1897, S. 12, einzig existenzfähig.

<sup>18</sup> Zinkkarbonat Kahlbaum entspricht dieser Zusammensetzung.



Wird *Zinkoxyd* einem *feuchten Kohlendioxydstrom*<sup>19</sup> ausgesetzt, so ändern sich die Kennzahlen der Fluoreszenz sehr rasch und gesetzmäßig, bis schließlich nach etwa *zwei Stunden* Werte erreicht werden, die denjenigen des *basischen Karbonats* nahezu gleichkommen. (Tafel 1, Figur 1.)

Tafel 1.

Nr.	Zeit in Minuten	K <sub>I</sub>	K <sub>V</sub>	K <sub>VI</sub>
1	—	33	3·3	72
2	2	22	1·8	48
3	5	20	1·4	39
4	10	18	1·4	35·5
5	20	16·5	1·4	35
6	30	16	1·4	36·5
7	45	15	1·4	41
8	60	14	1·4	53
9	120	14	1·4	57
10	bas. Karb.	11	1·4	56

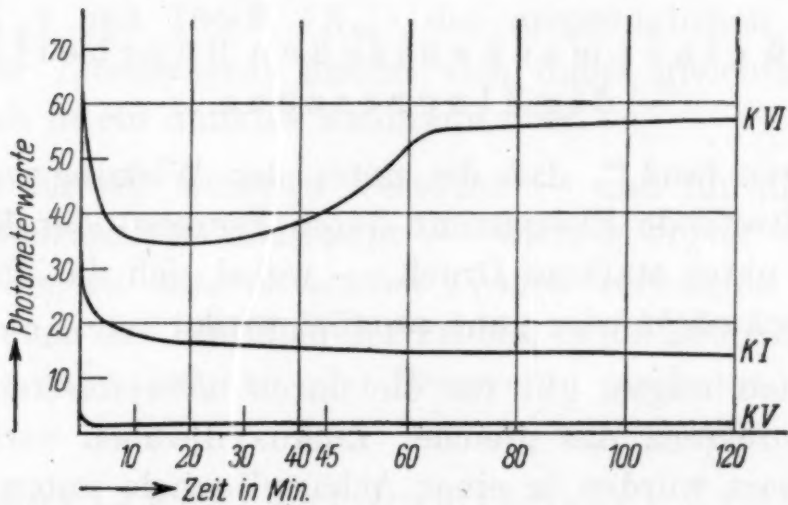


Fig. 1.

Zu obigen Zahlen ist zu sagen: Sieht man von den Werten für *K<sub>I</sub>* ab, die an sich weniger verlässlich sind, so ist die Übereinstimmung zwischen 9 und 10 überraschend gut. Das Minimum für *K<sub>VI</sub>* bei 5 dürfte rein optische Gründe haben.

Die Aufnahme von *Kohlendioxyd aus der Luft* erfolgt weit langsamer. Die oberflächliche Umwandlung scheint, wie aus den nachfolgenden Zahlen hervorgeht, erst nach *6 Wochen* annähernd beendet zu sein.

<sup>19</sup> Das CO<sub>2</sub> durchströmte eine wassergefüllte Waschflasche.

Tafel 2.

Tag	K <sub>V</sub>	K <sub>VI</sub>
7. III.	3·3	72
8. III.	2·2	60
10. III.	1·6	38
14. III.	1·4	35
18. IV.	1·4	50
bas. Karb.	1·4	56

Aus obigem folgt, daß der *Umwandlung des Zinkoxydes in das basische Karbonat* eine *stetige Änderung der Lumineszenz* entspricht. Es ist somit einerseits die Möglichkeit gegeben, diese *Umwandlung rein optisch* auf bequeme Weise zu *verfolgen*; anderseits muß bei der Untersuchung der Fluoreszenz des Zinkoxydes der störende Einfluß des Kohlendioxydes ausgeschaltet werden, was durch Aufbewahren der Proben in einem Exsikkator, der neben konz. Schwefelsäure noch Natronkalk enthält, leicht gelingt.

## 2. Einfluß einer mechanischen Bearbeitung auf die Fluoreszenz.

J. TAFEL fand<sup>20</sup>, daß die unter der Wirkung von *Kanalstrahlen* auftretende Fluoreszenz durch *Pressen* oder *Reiben* des Zinkoxydes unter starkem Druck — wobei sich das Pulver gelb färbt — *geschwächt* oder ganz *zerstört* wird.

Wie sich zeigte, gilt für die durch *ultraviolette Strahlung* erregte Fluoreszenz das gleiche. Zinkoxydproben verschiedener Darstellungsart wurden in einer Achatreibschale unter kräftigem *Drucke* gepulvert: in allen Fällen war eine mehr oder weniger deutliche *Schwächung des Fluoreszenzvermögens* festzustellen. Das durch Sublimation gewonnene kristallisierte Zinkoxyd gab beim Zerreiben ein braunes Pulver, das unter der Quarzlampe fast vollkommen dunkel blieb. Ein starker Einfluß des Druckes zeigte sich auch bei hochoerhitzten Oxydproben (800—1000°). Bei kalt gefälltem Oxyd war die Schwächung nur gering und eine Verfärbung kaum zu beobachten. Zinkoxyd Merck nimmt in bezug auf Schwächung der Lumineszenzfähigkeit und auf Gelbfär-

<sup>20</sup> J. TAFEL, Ann. Physik 11, 1903, S. 613 ff.



bung eine Mittelstellung ein. Es ergibt sich also, daß die *Druckwirkung um so stärker ausgeprägt ist, je höher das Oxyd zuvor erhitzt wurde.*

Als angenähertes *Maß für die Druckverformung* eines lockeren Pulvers, wie ein solches im ZnO-Merck vorliegt, kann die Verminderung des *Schüttvolumens* gelten (vgl. S. 81). Die Lumineszenzänderung ist daher in der Tafel 3 mit dieser in Beziehung gebracht:

Tafel 3.

Schüttvolumen	$K_I$	$K_V$	$K_{VI}$
200	33	3·2	72
175	27	2·6	50
150	20·5	2·0	38
125	15·3	1·6	34·5
100	6·2	0·3	10

Wie aus obigen Zahlen hervorgeht, verminderte sich die *Fluoreszenzstärke* nach wiederholtem Zerreiben auf 18·8% ( $K_I$ ), 9·4% ( $K_V$ ) und 13·9% ( $K_{VI}$ ) des ursprünglichen Wertes. Die *Farbe der Lumineszenz* ändert sich dabei gleichfalls und geht schließlich in ein dunkles Rehbrown über.

Als für die weiteren Versuche — und für die Praxis der Lumineszenzanalyse überhaupt — wichtig ergibt sich, daß ein *Pulvern der zu untersuchenden Proben vermieden werden muß* und daß auch das Einfüllen der Proben in die Beobachtungsgefäße vorsichtig ohne Drücken oder Pressen zu geschehen hat.

### 3. Abhängigkeit der Lumineszenz von der Darstellungsweise.

Sämtliche von uns dargestellten sowie die anderen uns vorliegenden *Zinkoxydpräparate*, die sich in irgendeiner Hinsicht voneinander unterscheiden, sind in den nachfolgenden Tafeln 4 und 5 zusammengestellt. Die *Fluoreszenzfarbe* ist durch die Angabe der Kennzahlen näher bestimmt. Als kennzeichnender Wert, der den Vergleich zwischen verschieden stark leuchtenden Präparaten erleichtert, ist außerdem noch der *Quotient*  $K_{VI}/K_V$  angeführt. Ferner sind *Bildungstemperatur*, *Farbe* und *scheinbare Dichte* (Schüttvolumen) in die Zusammenstellung aufgenommen worden.

Tafel 4.

Nr.	Bezeichnung	Luminiszenzfarbe	K <sub>I</sub>	K <sub>V</sub>	K <sub>VI</sub>	K <sub>VI</sub> / K <sub>V</sub>	Temp. in Graden	Schütt- volumen	Farbe
1	Merck, pro an.	hellgelbbraun	33	3.3	72	22	—	200	schwach gelbstichig
2	Kahlbaum, für zahnärztliche Zwecke	kreß (goldorange)	79	1.8	13.5	7.5	—	50	braungelb <sup>1</sup>
3	ZnO Merck, sublimiert	hellolivgelb	35.5	10.6	122	11.5	1200	—	weiß <sup>2</sup>
4	Durch Fällung	kreß	63	1.3	11	8	20	150	reinstes Weiß
5	Aus Zn(CH <sub>3</sub> ) gewonnen	"	52	1	7.5	7.5	20	—	weiß
6	ZnO Merck, gepulvert	dunkel rehbraun	6.2	0.3	10	33.3	20	100	bräunlich
7	Aus basischem Karbonat gewonnen	" rotbraun	7	0.16	2.4	15	300	337	weiß
8	(Basisches Karbonat)	veil	11	1.4	56	40	—	362.5 <sup>3</sup>	"
9	Aus Hydroxyd gewonnen	schwach graugelb	12	0.9	19	21	500	187.5	gelber Stich
10	Aus Azetat gewonnen	dunkelbraun	7.5	0.25	5	20	—	—	grau <sup>4</sup>
11	" Oxalat	ziegelfarben	28	0.2	3	15	400	—	blaß eremefarben <sup>5</sup>
12	" Nitrat	gelb	34	8.8	127	14.4	Rotglut	137.5	"
13	" Merck, mit NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> erhitzt	kreß	56	0.5	4	8	450	37.6	braungelb
14	ZnO Merck, mit NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> erhitzt	"	10	0.1	0.8	8	200	93.3	ziegelfarben <sup>6</sup>
15	" " " "	"	7.5	0.2	16	8	200	—	"
16	ZnO M., mit großer Flamme erhitzt	hellgrün	100	42	690	16.4	690	—	weiß
17	ZnO Merck, im H <sub>2</sub> -Strom erhitzt	intensiv hellgrün	500	250	4160	16.6	Rotglut	—	graubrauner Stich
18	Zinkweiß Grünsiegel <sup>7</sup>	grünlichgelb	45.5	16.4	285	17.4	—	237.5	weiß
19	" Rotsiegel <sup>8</sup>	"	37.3	12.9	210	16.3	—	225	"
20	" Grausiegel <sup>9</sup>	"	32.8	9	126	14	—	—	"
21	" Goldsiegel <sup>10</sup>	"	24.4	6	90	15	—	225	"
22	" Weißsiegel <sup>11</sup>	gr-gb-, braunstichig	32	6.1	117	19	—	—	"
23	Zinkweiß Sonnenmarke, Grünsiegel <sup>7</sup>	helloliv	35	7	81	11.6	—	225	"
24	Zinkweiß Top, Weißsiegel <sup>7</sup>	oliv	26.5	3.2	37	11.5	—	—	"
25	ZnO-Segoldus Grausiegel <sup>7,9</sup>	mattoliv	17	2	25	12.5	—	—	"
26	ZnO- " Sternsiegel <sup>7,10</sup>	"	15	1.6	17.8	11.2	—	137.5	"

<sup>1</sup> Sandiges Pulver, Korngröße etwa 23  $\mu$ . <sup>2</sup> Durchsichtige Nadeln, z. B. 200  $\mu$  lang, 2  $\mu$  breit. <sup>3</sup> Bezogen auf die 100 g ZnO äquivalente Menge. <sup>4</sup> Kohlehaltig. <sup>5</sup> Äußerst feinteiliges, zartes Pulver. <sup>6</sup> Gebrüder Dudek. <sup>7</sup> S. E. Goldschmidt & Sohn. <sup>8</sup> Über diese interessante Form wird an anderer Stelle näher berichtet werden. <sup>9</sup> Enthält nach RASER, Farbe und Lack, 1923, S. 91, 90—92 % ZnO und etwa 6 % Pb. <sup>10</sup> Ebenfalls bleihaltig.



Tafel 5.

Nr.	Bezeichnung	Lumineszenzfarbe	K <sub>I</sub>	K <sub>V</sub>	K <sub>VI</sub>	K <sub>VI</sub> / K <sub>V</sub>	Temp. in Graden	Farbe
(1)	Zinkoxyd Merck	hellgelbbraun	33	3·3	72	22	20	schwach gelbstichig
27	" "	"	—	3·2	70·5	22	110	" "
28	" "	"	—	2·6	58·5	21·5	175	" "
29	" "	schwächer gelbbraun	—	2·5	58	23·2	250	" "
30	" "	" "	—	2·2	52	23·6	320	" "
31	" "	" "	—	2·2	47	21	340	" "
32	" "	" "	—	2·2	50	22·7	370	" "
33	" "	" "	—	2	49	24·5	420	" "
34	" "	" "	—	1·4	34	24·3	470	" "
35	" "	" "	—	1·4	30	21·4	520	" "
36	" "	" "	17	1·1	24	21·8	570	" "
37	" "	schwach graugelb	—	0·8	20·5	25	595	kaum verändert
38	" "	" "	—	1·2	24·3	20·2	620	" "
39	" "	" "	21	1·4	30	21	670	" "
40	" "	" "	24	1·8	32	17·7	720	gelber Stich deutl.
41	" "	dunkeloliv	—	2·2	36	16	770	" " "
42	" "	"	—	2·6	37	14·2	820	" " "
43	" "	"	25	2·7	36·5	13·4	840	" " "
44	" "	"	—	2·9	39·3	13·5	890	" " "
45	" "	"	40	6	73	11·8	970	" " "
46	" "	helloliv	54	10	117	11·7	1070	" " "
47	" "	"	60	11	125	12·5	1200	stark gesint., gelbl.
(2)	ZnO Kahlbaum	kreß	79	1·8	13·5	7·5	20	gelbbraun, Schüttvol. 50
48	" "	"	79	1·3	11	8·5	320	" " 50
49	" "	"	41·2	0·8	9	11·2	500	" " 50
50	" "	schwach kreß	11·6	0·2	3·5	17·5	600	" " 50
51	" "	" "	12·3	0·15	4·3	28·7	800	" " 50
52	" "	{ sehr schwache Lumineszenz }	10	0·06	3·4	56·6	1000	{ schwächer gefärbt als 2. Schüttvol. 50 }

Die *Zinkoxydarten* lassen sich auf Grund ihrer Fluoreszenzfarbe in die folgenden *Gruppen* einteilen:

1. Fluoreszenzfarbe *Gelbbraun*: ZnO M. und daraus durch Erhitzen bis zu 600° hergestellte Präparate (Nr. 1 u. 27—37).

2. Fluoreszenzfarbe *Kreß*: Präparate Nr. 2, 4, 5, 11, 13, 14, 15, 48—51.

3. Fluoreszenzfarbe *Dunkelbraun*: Präparate Nr. 6, 7, 10, 52.

4. Fluoreszenzfarbe *Oliv*: Präparate Nr. 3, 38—47, Zinkweißsorten Nr. 23—26.

5. Fluoreszenzfarbe *Grünlichgelb* bis *Hellgrün*, Präparate Nr. 16—17, Zinkweißsorten Nr. 18—22.

Die Photometerablesungen sind, was den *Farbton* der Fluoreszenz betrifft, nicht unmittelbar vergleichbar, da die Fluoreszenzhelligkeiten verschieden sind. Durch Einführung des Bruches  $K_{VI}/K_V$  gewinnt man jedoch einen den Farbton — wenn auch nicht eindeutig — kennzeichnenden Wert. So geben die drei fluoreszierenden Proben: 19, 16, 17, deren Fluoreszenzintensitäten sich verhalten wie 1 : 3 : 20 ( $K_{VI}$ ), die Quotienten 16·3, 16·4, 16·6, weshalb sie als zusammengehörig betrachtet werden können. Die *oliv* fluoreszierenden Proben geben die nahe beisammen liegenden Werte: 11·2, 11·5, 11·5, 11·6, 11·7, 12·5; die *kreß* erscheinenden Sorten liefern die Quotienten: 7·5, 7·5, 8, 8, 8, 8.

In der Literatur werden noch die folgenden Lumineszenzfarben für Zinkoxyd oder Zinkweiß angegeben: *hell Kanariengelb* (durch Verbrennen von Zn-Kahlbaum erhaltenes Oxyd)<sup>21</sup>, *leuchtend Kanariengelb*, *schmutzig Orange* (ziemlich dunkel), *schmutzig Kanariengelb*<sup>22</sup>, *Olivgrün* (Zinkweiß *Rot-*, *Grünsiegel*, Zinkgrau), *lebhaft Gelb* mit schwachem Grünstich<sup>23</sup>, *Schwefelgelb* (Zinkweiß Schneeweiß, sehr rein), *Gelb*, *Dunkelockergelb* (Zn-Weiß Kadox), *Tiefbraun* (Zinkgrau, Pb, Fe, Cu), *schwach Rosa* (Zinkweiß leicht, Fe, Pb)<sup>24</sup>, *Rötlichgelb*<sup>25</sup>, *Gelbgrün*<sup>26</sup>, *Grünlich*, *Hellgrün*, *Gelbbraun*, *stark Gelb* (sorgfältig gereinigtes ZnO)<sup>27</sup>.

Auch die hier gekennzeichneten Farben können zwanglos einer der oben angeführten Gruppen zugeordnet werden. Neu hinzukommen würde höchstens die Farbe „schwach Rosa“.

Sucht man nach dem *Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und Darstellungsart* und faßt man zunächst die Gruppe der *kreß* fluoreszierenden Präparate ins Auge, so fällt auf, daß auf ganz verschiedene Weise, nämlich 1. durch Fällung (12, 4), 2. aus  $Zn(CH_3)_2$  (5), 3. durch Erhitzen von Nitrat (13, 4) von  $ZnO$  M. mit  $NH_4NO_3$  (14, 15) und 5. von Oxalat (11) gewonnene Oxydsorten sich in bezug auf die Fluoreszenz ähnlich verhalten.

Als *gemeinsames Merkmal* dieser Präparate ergibt sich lediglich die verhältnismäßig *niedrige Bildungstemperatur*. Diese ist bei

<sup>21</sup> R. ROBL, Z. ang. Chem. 39, 1926, S. 608.

<sup>22</sup> A. EIBNER, L. WIDENMEYER, A. STOIS, Farben-Ztg. 31, 1926, S. 2399.

<sup>23</sup> K. SCHMIDINGER, Farben-Ztg. 31, 1926, S. 2451.

<sup>24</sup> F. KIRCHHOF, Kautschuk, 4, 1928, S. 25.

<sup>25</sup> G. CAPELLI, Annali Chim. appl. 17, 1927, S. 513.

<sup>26</sup> LAHNSTEIN, Zollrundschau, 1927, Nr. 18.

<sup>27</sup> E. KÖRNER, Dissertation, Greifswald 1930.



4 und 5 20°, bei 14, 15 200°, bei 11 400° und bei 13 450°. Um zu prüfen, ob dies tatsächlich maßgebend sei, wurde das Präparat 10 hergestellt. Leider erhält man aus dem *Azetat* normalerweise ein Oxyd, das Kohle enthält, von welcher es nur durch starkes Glühen befreit werden kann. Durch vorsichtiges Erhitzen konnte aber ein *kohlefreies*, teilweise zersetztes Azetat gewonnen werden; unter der Quarzlampe erschienen die unzersetzten Anteile hellbläulich-weiß, die zersetzten hellkreß! — *Zinkoxalat*, kurze Zeit auf 300° erhitzt, erschien, ganz entsprechend, teils hellbraun bis kreß, teils veil, schwach erhitztes *Zinkkarbonat*, veil, hellgelbbraun, kreß und dunkelbraun <sup>28</sup>.

Erhitzt man *gefälltes Oxyd*, *Karbonat* oder *Oxalat* auf Rotglut, so verschwindet die kresse Fluoreszenz, um einer *gelbgrünen* Platz zu machen. Anders verhält sich das aus *Nitrat* entstandene Oxyd; seine Lumineszenz wird nach dem Erhitzen auf höhere Temperaturen zunehmend schwächer, und das bei 1000° geglühte Oxyd ist nahezu lumineszenztot (Präparate Nr. 2, 48—52).

Es ist bekannt, daß das aus Zinknitrat gewonnene Oxyd hartnäckig Stickoxyde okkludiert hält <sup>29</sup>, die nur durch starkes Glühen entfernt werden können. Seine Fluoreszenz könnte daher allenfalls mit dieser Tatsache in Zusammenhang gebracht werden.

Die folgende Zusammenstellung (Tafel 6) bringt das Ergebnis der *Prüfung auf Nitrat mit Bruzinschwefelsäure* <sup>30</sup>, verglichen mit der *Schwächung der Fluoreszenzintensität*.

Tafel 6.

ZnOKahlbaum, 1/2 Stunde er- hitzt auf Grade	Bruzinreaktion	Intensität der Fluoreszenz (Kv)
320	stark positiv	1000
800	schwach positiv	10
1000	negativ	5

Abnahme der Fluoreszenzstärke und Abnahme des Nitratgehaltes gehen also symbat. Trotzdem kann es sich nicht um einen ursächlichen Zusammenhang handeln, wie folgender Versuch zeigt:

Zinkoxyd Kahlbaum wurde mit verdünnter Natronlauge nach Zusatz von etwas DEVARDASCHER Legierung erwärmt. Wie an

<sup>28</sup> Fluoreszenzfarbe des Präparates 7.

<sup>29</sup> MARIGNAC, Arch. phys. nat. [3] 10, 1883, S. 193; MORSE und WHITE, Am. chem. J. 14, 1892, S. 314; vgl. auch JUNG und KUNAU, Z. physikal. Chem. B, 15, S. 45.

<sup>30</sup> TREADWELL, Lehrbuch der analytischen Chemie, I, 1930, S. 405.

dem Geruche leicht kenntlich war, entwickelte sich infolge der Reduktion der Nitratreste Ammoniak, das überdies in der Lauge mit NESZLER-Reagens nachgewiesen werden konnte. Das Erwärmen wurde bis zum vollständigen Austreiben des Ammoniaks fortgesetzt (negative NESZLER-Reaktion). Das Zinkoxydpulver gab dann nur mehr eine minimale Bruzinreaktion; die Fluoreszenz blieb aber unverändert.

Das Zustandekommen der kressen Fluoreszenz betreffend, kann also zusammenfassend gesagt werden, daß sie bei Zinkoxyden aufzutreten pflegt, die bei Temperaturen *unterhalb der Rotglut* entstanden sind und daß sie, je nach der Ausgangsverbindung, in einem größeren oder nur in einem kleinen Temperaturgebiet beständig ist.

Zinkoxyde, die stark *grüne Fluoreszenz* zeigten, waren aus ZnO M. gelegentlich von Vorversuchen erhalten worden, bei welchen die in einem Porzellantiegel befindlichen Proben mit Hilfe eines starken *Bunsenbrenners* erhitzt wurden (Nr. 16). Die durch Glühen von ZnO M. im *Elektroofen* hergestellten Präparate zeigten niemals diese grüne Fluoreszenz. Spätere Versuche ergaben, daß sie nur dann auftritt, wenn die Flamme genügend groß ist, so daß die Flammengase den Tiegel umspülen können. Da somit die Vermutung nahelag, daß es darauf ankäme, daß Erhitzen in einer reduzierenden Atmosphäre vorzunehmen, wurde etwas ZnO M. in einem Porzellanschiffchen zur Rotglut erhitzt ( $\frac{1}{2}$  Stunde), während gleichzeitig Wasserstoff darübergeleitet wurde. Die im Wasserstoffstrom erkaltete Probe (17) zeigte in der Tat grüne Fluoreszenz, und zwar in einer Stärke, die diejenige aller anderen Präparate und auch die der Vergleichs-Uranglassscheibe bei weitem übertraf. — Ganz wie das ZnO M. verhielt sich das kreß fluoreszierende ZnO 2.

Es wurde bereits erwähnt, daß auch einige Zinkweißarten, nämlich Nr. 18—22, grünlich fluoreszieren. Die Annahme, daß diese Sorten bei ihrer Entstehung der Einwirkung von Flammgasen ausgesetzt waren, dürfte, wenn man die gebräuchlichen Gewinnungsverfahren für Zinkweiß in Betracht zieht, berechtigt sein.

Die nächste zu besprechende Gruppe umfaßt die *oliv fluoreszierenden Präparate*. Solche ergaben sich, wenn ZnO M. im Elektroofen auf Temperaturen erhitzt wurde, die über 600° lagen. Auch das sublimierte Oxyd und einige Zinkweißsorten (Nr. 23—26), über deren Bildungsweise uns keine Angaben vorliegen, gehören hieher.

Was schließlich die unter der Quarzlampe *dunkelbraun bis*



*schwarz erscheinenden Präparate* betrifft, so scheinen drei wesentlich verschiedene Fälle vorzuliegen.

a) Die durch *Pulvern* bewirkte *Schwächung des Lumineszenzvermögens* ist eine aus der Chemie der Phosphore bekannte Erscheinung<sup>31</sup>, die an verschiedenen Substanzen beobachtet wurde, weshalb hier nicht weiter darauf eingegangen wird.

b) Einer anderen Ursache ist offenbar die *dunkelrotbraune Fluoreszenz* des aus basischem Karbonat durch mehrstündiges Erhitzen auf etwa 300° gewonnenen Oxydpräparats (7) zuzuschreiben. Das auffallendste physikalische Merkmal dieses Präparates ist seine *lockere Beschaffenheit*. Zur Charakterisierung dieser Eigenschaft bedienten wir uns der Messung des *Schüttvolumens*. 2 g der betreffenden Probe wurden vorsichtig, ohne Rütteln, in das unten geschlossene, kalibrierte Rohr eines CHANCELSCHEN *Sulfurimeters* gefüllt. Der abgelesene Wert wurde dann auf  $\text{cm}^3/100 \text{ g}$  umgerechnet. Die bei der Zersetzung 100 g ZnO liefernde Menge des basischen Karbonates hatte ein Schüttvolumen von 362.5, das daraus entstandene Oxyd ein solches von 337<sup>32</sup>, das also nur um ein geringes kleiner war. Man könnte von einer „*Restform*“ im Sinne KOHL-SCHÜTTERS sprechen.

In chemischer Hinsicht sind, was vielleicht noch bemerkenswert ist, die wie oben gewonnenen Präparate nach HÜTTIG, KOSTELITZ und FEHER<sup>33</sup> durch einen hohen katalytischen Wirkungsgrad gegenüber dem Methanolzerfall ausgezeichnet.

c) Während das aus dem Karbonat gewonnene Oxyd durch stärkeres Glühen in den lumineszenzfähigen Zustand übergeführt wird, entsteht umgekehrt aus dem leuchtfähigen Präparat (2) durch Erhitzen auf hohe Temperaturen das lumineszenztote Zinkoxyd Nr. 52. Dieses unterscheidet sich von jenem wesentlich (Schüttvolumen: 50, gelbbraune Farbe), nicht merklich aber von dem fluoreszierenden Präparat, aus dem es entstanden ist.

Rückblickend ist zu sagen, daß recht verwickelte Verhältnisse vorliegen, deren Aufklärung noch nicht gelingt.

#### 4. Physikalische Eigenschaften und Fluoreszenz.

Von den physikalischen Eigenschaften, die mit der Flu-

<sup>31</sup> LENARD und KLATT, Ann. Physik, 12, 1903, S. 5439.

<sup>32</sup> Höchster gemessener Wert! Vgl. auch Tafel 4.

<sup>33</sup> HÜTTIG, KOSTELITZ und FEHER, Z. anorg. Chem. 198, 1931, S. 206.

<sup>33</sup> FISCHHÄNDLER, siehe Anmerkung 3.

oreszenz in Beziehung gesetzt werden können, wäre zunächst die *Eigenfarbe* zu nennen. Die Betrachtung der Tafel 4, namentlich Gegenüberstellung der Proben 2 und 4 und der Proben 4, 7 und 16 zeigt aber, daß kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Färbung und der Fluoreszenzfarbe besteht.

Dasselbe gilt für das *Schüttvolumen*, wie ein Vergleich der Präparate 7, 6 und 52, ferner von 2 und 52 ergibt.

Um den *Einfluß der Korngröße auf die Fluoreszenz* zu untersuchen, zerlegten wir eine größere Menge ZnO M. und verschiedener Zinkweißsorten durch *Siebung* in mehrere Fraktionen, deren Teilchengröße zwischen  $70\mu$  und  $640\mu$  lag. Durch Vergleich der Proben unter der Quarzlampe waren Unterschiede in der Fluoreszenzstärke nicht einwandfrei feststellbar. Das Stufenphotometer ermöglichte wohl den Nachweis solcher Unterschiede, doch waren die aus den gemessenen Werten sich ergebenden Kurven so komplizierter Art, daß der Korngrößenwirkung ein anderer Einfluß überlagert zu sein schien. Als solcher kommt in erster Linie die *Einwirkung des Kohlendioxydes der Luft*, dem ja während des Siebens eine große Oberfläche geboten ist, in Betracht. Es ist bekannt, daß die Geschwindigkeit der  $\text{CO}_2$ -Aufnahme von der Korngröße abhängig ist<sup>34</sup>; ferner wurde gezeigt (s. S. 72), daß die durch die Einwirkung des Kohlendioxydes verursachte Fluoreszenzänderung das Auftreten eines Minimums in der  $K_{\text{VI}}$ -Kurve mit sich bringt, Faktoren, die zur Erklärung der Unregelmäßigkeiten herangezogen werden könnten.

Wenn so der Einfluß der Korngröße auf die Fluoreszenz bei ZnO in verlässlicher Weise nicht erfaßt werden kann, würde doch der Vergleich mit dem Verhalten eines luftbeständigen Stoffes gewisse Schlüsse zu ziehen gestatten, worauf wir vielleicht später noch zurückkommen werden.

Durch *Siebung* werden naturgemäß nicht die Primärteilchen isoliert (deren Größe bei Zinkweiß Bruchteile eines Mikrons betragen mag), sondern schon verhältnismäßig große Teilchengruppen. Würde ein erheblicher Einfluß der *Primärteilchengröße* auf die Fluoreszenz bestehen, so müßte dies im Fluoreszenzmikroskop zu erkennen sein. Das ist nicht der Fall; zumindest können Unterschiede im *Farbton* der Fluoreszenz (vgl. Gruppen 1—5, S. 77) nicht durch die verschiedene Größe der Primärteilchen erklärt werden.

---

<sup>34</sup> FISCHHÄNDLER, siehe Anmerkung 3.



## 5. Thermische Vorbehandlung und Fluoreszenz.

Der *Einfluß einer thermischen Vorbehandlung auf die Fluoreszenz* des Zinkoxydes Nr. 2 ist in Tafel 5 und in Fig. 2 dargestellt. Erhitzt wurde in einem *Elektromuffelofen*. Die Erhitzungsdauer betrug stets eine halbe Stunde. Zur Aufnahme der etwa 5 g schweren Einwaage diente ein Porzellantiegel.

Eine Betrachtung der Kurven  $K_V$  und  $K_{VI}$ <sup>35</sup> in Fig. 2 läßt erkennen, daß die Intensität der Fluoreszenz zunächst (bis etwa 400°) langsam, dann stärker abfällt, um bei 600° ein scharf ausgeprägtes Minimum zu erreichen, worauf sie bis zu der bei 1200° liegenden höchsten Versuchstemperatur ständig ansteigt. In den aufsteigenden Kurvenästen fällt ferner noch ein Knick auf, der bei ungefähr 900° liegt. Die Kurve  $K_{VI}/K_V$  zeigt, daß in dem Gebiet des Minimums auch ein Umschlag der Fluoreszenzfarbe erfolgt. Aus Tafel 5 geht hervor, daß es sich um den Übergang von Gelbbraun nach Oliv handelt.

Man könnte daran denken, daß diese Erscheinung durch eine Modifikationsänderung<sup>36</sup>, die das Zinkoxyd erleidet, bedingt sei. Auch E. KÖRNER<sup>37</sup>, der gleichfalls einen Umschlag der Lumineszenzfarbe, allerdings umgekehrt von Grün nach Gelb und bei höherer Temperatur, die aber nicht genau angegeben ist, fand, vermutete dies, konnte jedoch durch röntgenographische Untersuchung seiner verschiedenen lumineszierenden Präparate keine Gitteränderung nachweisen<sup>38</sup>.

Die *auf verschiedene Temperaturen erhitzten Zinkoxydproben* bilden eine *Reihe*, in der sich die *physikalischen Eigenschaften in bestimmtem Sinne ändern*. Besonders augenfällig sind die Veränderung des *Schüttvolumens* und der *Farbe*. Die *Farbänderung* wurde durch Messung mit dem Stufenphotometer zu erfassen versucht. Als kennzeichnender Wert ist der Lichtrückwurf bei Vorschaltung des blauen Filters  $K_{VI}$  (bezogen auf Barytweiß) in Tafel 7 und Fig. 2 eingetragen (Kurve *F*). Das *Schüttvolumen* wurde, wie S. 81 angegeben, bestimmt und gleichfalls in Tafel 7 und Fig. 2 verzeichnet (Kurve *Sch*). Als dritte von der Glühtempe-

<sup>35</sup> Der Ordinatenmaßstab wurde *logarithmisch* gewählt, da die zu vergleichenden Werte sich über 4 Zehnerpotenzen erstrecken.

<sup>36</sup> Nach EWLES, Phil. Mag. (6) 45, S. 957, besitzt das ZnO einen Umwandlungspunkt bei 700°, nach JANDER und STAMM, Z. anorg. Chem. 199, S. 165, liegt dieser bei 680°.

<sup>37</sup> a. a. O., S. 30.

<sup>38</sup> Vgl. auch Anm. 2.

ratur abhängige Größe wurde der Gewichtsverlust bestimmt, den die Zinkweißproben während der halbstündigen Erhitzung erlitten (Tafel 8 und Kurve *G* in Fig. 2).

Tafel 7.

Temp. in Graden	Schüttvolumen	Farbe ( $K_v$ )
20	200	100
370	200	100
470	190	100
570	190	100
670	190	100
720	175	100
770	150	100
840	125	100
890	100	96
970	76	88
1070	63	83
1200	50	78

Tafel 8.

Temp. in Graden	Gew.-Verlust in Prozenten
20	0·1 <sup>39</sup>
105	0·127
175	0·133
250	0·16
300	0·19
420	0·19
520	0·19
620	0·18
720	0·18
820	0·19
880	0·27
650	0·25
1000	0·28
1100	0·34

Vergleicht man den Verlauf der Kurven *F* und *Sch* mit dem der Kurve  $K_v$ , so erkennt man, daß jene bis etwa 700° parallel oder nahezu parallel zur Abszissenachse verlaufen, während diese in demselben Gebiet stark abfällt, ein Minimum durchläuft und wieder ansteigt, daß also einer erheblichen Veränderung der Fluoreszenzstärke keine merkliche Veränderung der betreffenden physikalischen Eigenschaften gegenübersteht, was ja auch mit dem unter 4. Gesagten übereinstimmt.

In dem Gebiete oberhalb 700° sind zunächst die Kurven *G*, *F* und *Sch* gemeinsam zu betrachten. Sie drücken den Vorgang der *Sinterung* aus, durch welchen aus dem zuvor nur schwach gelbstichigen lockeren Pulver dichte und harte, deutlich gelb gefärbte Körner entstehen. Das Ansteigen der Gewichtsverlustkurve (*G*) oberhalb 700° ist durch die zunehmende *Verflüchtigung* des  $ZnO$  zu erklären<sup>40</sup>. Diese hat ihrerseits das Wachsen der großen Körner auf Kosten der kleinen und damit die Verminderung des Schütt-

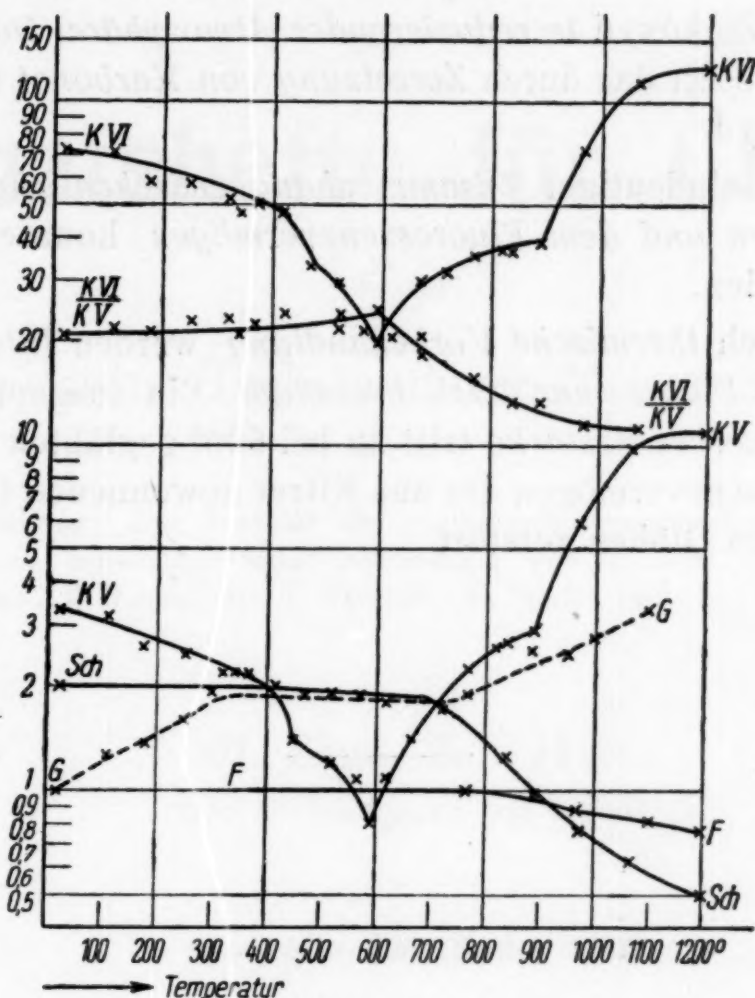
<sup>39</sup> Die Proben kühlten stets in einem mit konz. Schwefelsäure und Natronkalk beschickten Exsikkator aus. Der bei 20° verzeichnete Wert ist der Gewichtsverlust, den unbehandeltes Zinkoxyd Merck unter diesen Bedingungen erleidet.

<sup>40</sup> Nach W. W. EWING, Ind. Eng. Chem. 23, 1931, S. 427, hat  $ZnO$  bereits bei 500° einen beträchtlichen Dampfdruck und ist schon bei dieser Temperatur ein Partikelwachstum festzustellen.



volumens zur Folge. Die Farbvertiefung mag wieder mit der Kornvergrößerung zusammenhängen.

Mit der fortschreitenden Sinterung ist nun ein starker Anstieg des Fluoreszenzvermögens verbunden. Es läßt sich jedoch einstweilen nicht entscheiden, durch welchen Faktor dieser bedingt ist.

Fig. 2<sup>41</sup>.

### Zusammenfassung.

1. Die Annahme, daß die an Zinkoxydpräparaten zu beobachtende Fluoreszenz diesem selbst zukomme und nicht durch Fremdmetallspuren bedingt sei, erscheint begründet.

2. Die Einwirkung des Kohlendioxydes auf Zinkoxyd ist von einer Fluoreszenzänderung begleitet. Mit Hilfe des Stufenphotometers kann die Reaktion, die zur Bildung von basischem Zinkkarbonat führt, auf optischem Wege verfolgt werden.

3. Durch Pulvern wird das Fluoreszenzvermögen des Zinkoxydes stark vermindert.

<sup>41</sup> Ordinationsmaßstab für Kurven Sch, F mit 100, für Kurve G mit  $\frac{1}{10}$  zu multiplizieren!

4. Als *Fluoreszenzfarben* der Zinkoxydpräparate verschiedener Darstellungsart sind zu unterscheiden: *Gelbbraun, Kreß, Oliv, Grün* und *Dunkelbraun*.

5. Die *Fluoreszenzfarbe Kreß* pflegt an Oxydpräparaten aufzutreten, die bei verhältnismäßig *niedriger Temperatur* entstanden sind. Präparate von intensiv *grüner Fluoreszenz* erhält man durch *Glühen* von Zinkoxyd in *reduzierender Atmosphäre*. *Dunkelbraune Fluoreszenz* zeigt das durch *Zersetzung von Karbonat* bei 300° gewonnene Oxyd.

6. Ein eindeutiger *Zusammenhang zwischen physikalischen Eigenschaften und dem Fluoreszenzvermögen* konnte nicht festgestellt werden.

7. Durch *thermische Vorbehandlung* werden *Intensität und Farbton der Fluoreszenz* stark *beeinflusst*. Ein ausgeprägtes *Minimum der Fluoreszenzstärke* tritt an bei 600° geglühten Proben auf. Das *Fluoreszenzvermögen* des aus Nitrat gewonnenen Oxydes wird durch starkes *Glühen zerstört*.

---